

A KAR-2, egy antimitotikus ágens egyedi farmakológiájának atomi és molekuláris alapjai

Horváth István



Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola
Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program
Programvezető: Dr. Gráf László

Témavezető: Dr. Ovádi Judit D.Sc.
Tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia
Enzimológiai Intézet

Budapest, 2009

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban Dr. Ovádi Juditnak a témavezetésért és hogy lehetővé tette számomra, hogy az Enzimológiai Intézetben végezzem doktori munkámat. Köszönet illeti Hlavanda Emmát és Nuridsány Mimit a gyakorlati munkában nyújtott segítségért. Külön köszönet jár Dr. Orosz Ferencnek a doktori munkámhoz nyújtott elméleti útmutatásokért, valamint a dolgozatom készítése során adott tanácsokért. Köszönet illeti továbbá, az ELTE TTK Elméleti Kémia tanszéken dr. Harmat Veronikát, hogy megismertetett a röntgenkrisztallográfiás szerkezetmeghatározás rejtelseivel; a Biokémia tanszéken Dr. Nyitrai Lászlót, mivel lehetővé tette, hogy a laborjában a rekombináns CaM-nal dolgozhassak, valamint a Szerves Kémia tanszéken Dr. Perczel Andrást és Pálfi Villót az NMR mérésekért, illetve a spektrumok asszignációjáért.

Külön köszönettel tartozom Ovádi csoportból Demeter Katalinnak, Lehotzky Attilának, dr. Oláh Juditnak, Tökési Natáliának, Vincze Orsolyának és Zotter Ágnesnek az elmúlt években nyújtott segítségért és a nagyszerű és inspiráló munkahelyi (és azon kívüli) hangulat megteremtéséért.

Mindezekon felül természetesen köszönettel tartozom Családomnak, akiknek a támogatása nélkül nem léphettem volna erre a csodálatos pályára.

Végül, de nem utolsósorban pedig köszönet illeti a Richter Gedeon Centenárium Alapítványt a 2009. évben nyújtott anyagi támogatásért.

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ADP: adenzin-difoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

AMP: adenzin-monofoszfát

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CaM: kalmódulin

CD: cirkuláris dikróizmus

DTE: ditioeritritol

EDTA: etilén-diamin- N,N,N',N'-tetraecetsav

EGTA: etilénlikol-bisz(β -aminoetiléter)- N,N,N',N'-tetraecetsav

GTP: guanozin-trifoszfát

HEPES: N-(2-hidroxietil) piperazin- N'-(2-etánszulfonsav)

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

KAR-2: 3'-(β -klóretil)-2',4'-dioxo-3,5'-spiro-oxazolidino-4-deacetoxi-vinblasztin

LDH: laktát-dehidrogenáz

MAP: mikrotubulus asszociált fehérje

MK: miokináz

MT: mikrotubulus

NAD(H): nikotinsavamid-adenin-dinukleotid oxidált és redukált formája

NMR: mágneses magrezonancia

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

PEG: polietilénlikol

PEP: foszfoenol-piruvát

PDE: foszfodiészteráz

P-gp: P-glikoprotein

PK: piruvát kináz

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

RU: response unit

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SPR: felületi plazmon rezonancia

TCA: triklór-ecetsav

TPPP: Tubulin Polymerization Promoting Protein

TFP: trifluoperazin

TRIS: trisz-(hidroximetil)-aminometán

BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések korunk társadalmának egyik legnagyobb kihívásai. A rák terápiája az elmúlt évtizedekben jelentős változásokon ment át. A 60-as években indult nagyszabású molekulaszűrési vizsgálatok eredményeként számos természetes eredetű, sejtosztódásgátló molekulát azonosítottak. Ezen anyagok között voltak a vinca alkaloidok és a taxánok, amelyek felfedezésük óta már terápiás körülmények között is bizonyították hatékonyságukat. Ez a két azonosított sejtosztódásgátló vegyületsoport felfedezése idején forradalminak számított, ugyanis az addig használt kemoterápiás készítményekkel ellentétben nem a sejtek DNS állományát károsítják, hanem a tubulin/MT alkotta mitotikus orsóhoz kötődve meggátolják a sejtosztódást. Ezen molekulák két képviselője a *Vinca roseus*-ból izolált vinkrisztin és vinblasztin, melyek valóban hatékonyak a sejtosztódás megakadályozásában. Komoly hátrányuk hogy nem specifikusak, egyrészt nem csak a tumorsejteket támadják, másrészt a tubulin/MT rendszeren kívül más fehérjékhez is kötődhetnek, ezáltal módosítva azok funkcióját.

Az utóbbi évtizedben ezen molekulák toxicitását félszintetikus módosításokkal próbálták csökkenteni, ennek eredményeként jelentek meg az ún második generációs vinca alkaloidok. Ezen molekulák körébe tartozik a kutatócsoportunk és a Richter Gedeon NyRt. együttműködésében előállított vinblasztin származék, a KAR-2. Ezt a molekulát kutatócsoportunk és együttműködő partnereink vizsgálatai során hatékony sejtosztódásgátló vegyületnek találtuk, amely emellett enyhébb toxikus mellékhatásokkal rendelkezik, mint a természetes vinca alkaloidok. Ezen eredmények ismeretében feltételezték, hogy az enyhébb mellékhatások oka az, hogy a természetes vinca alkaloidokkal ellentétben a KAR-2 nem gátolja az eukarióta sejtekben általánosan előforduló Ca^{2+} -szenzor fehérje, a CaM működését, amely számos életfolyamat szabályozásában vesz részt. Doktori munkám célkitűzése az volt, hogy magyarázatot találjak arra, mi okozza a KAR-2 vinblasztintől eltérő farmakológias viselkedését és ezáltal felderítsem ennek az új vinca alkaloidnak a hatásmechanizmusát. Munkám során a molekula CaM-nal való kölcsönhatásának vizsgálatára fókuszáltam mivel a korábbi eredmények azt sugallták, hogy a két vinca alkaloid eltérő mértékű mellékhatásainak hátterében különböző mértékű CaM gátló hatásuk

áll. Ebből a célból mind szerkezeti mind pedig funkcionális illetve kötődési vizsgálatokat kívántam végezni. A szerkezeti vizsgálatok során több módszer (röntgenkristallográfia, NMR, CD spektroszkópia) párhuzamos alkalmazásával terveztem meghatározni a KAR-2 molekula kötőhelyét a CaM-on. A kötődési, valamint funkcionális tesztek segítségével az kívántam vizsgálni, hogy a korábban tapasztalt anti-CaM hatásbeli különbségek más célfehérjék esetén is fennállnak-e. A tervezett vizsgálatok eredményei támpontként szolgálhatnak további hatékonyabb, enyhébb mellékhatású vinca alkaloidok szintéziséhez.

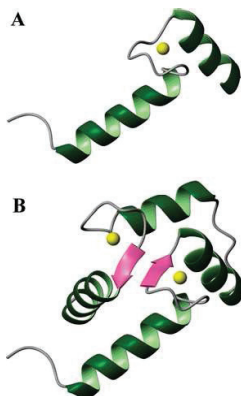
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kalmodulin

A CaM szerkezete

A CaM az EF-hand-et tartalmazó fehérjék szupercsaládjába tartozó, 148 aminosavat tartalmazó, 16 kDa tömegű fehérje. Valamennyi, ebbe a családba tartozó fehérje (pl.: parvalbumin, troponin, S100) Ca^{2+} ionok kötésére képes. A Ca^{2+} az élő sejt számára nélkülözhetetlen, számos fiziológias folyamat függ szabályozó tevékenységétől, hatását fehérjékhez kötődve fejt ki.

A Ca^{2+} kötő fehérjék legfontosabb szerkezeti régiója a már említett EF-hand, amely a Ca^{2+} -kötésért felelős (1) (1. ábra). A legtöbb Ca^{2+} - kötő fehérje rendelkezik ilyen szerkezeti részlettel.

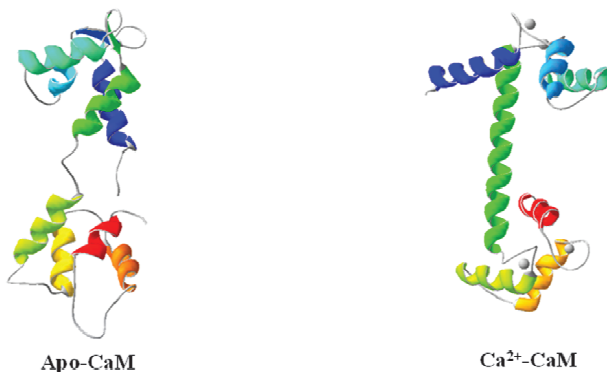


1. ábra A Ca^{2+} kötő EF-hand szerkezete. Önmagában (A) illetve két EF-hand párosával (B) (2)

Az EF-handben két α -hélix valamint egy közöttük elhelyezkedő hurok található, ez utóbbi koordinálja a Ca^{2+} ionot. A CaM esetén 29 aminosavból áll (1. ábra). A két hélix csaknem merőleges egymásra, az elnevezés is erre utal, mivel olyannak kell elképzelni az

orientációjukat, mint amit akkor látunk, ha a jobb kezünk kinyújtott mutatóujját és hüvelykujját nézzük. Az EF-hand általában párosan fordul elő a fehérjékben, mivel ebben az esetben a kialakuló antiparalell β redő szerkezet stabilizálja a két EF-handet. A CaM 2-2 EF-handet tartalmaz az N- illetve a C-terminális doménjében, ezek segítségével maximálisan 4 Ca^{2+} -t tud megkötni. A Ca^{2+} az EF handben 7 oxigénnel létesít kapcsolatot: 3 aszpartát 3 karboxilát oxigénjével, egy glutamát 2 karboxilát oxigénjével, egy gerinc karbonil és egy vízmolekula oxigénjével (2).

A Ca^{2+} -kötés a fehérjében konformációváltozást idéz elő, amely számos spektroszkópai módszerrel (CD, fluoreszcencia) kimutatható (3). A CaM Ca^{2+} affinitása 10^{-6} M nagyságrendű disszociációs állandóval jellemezhető, az egyes kötőhelyek nem teljesen egyenértékűek: a C-terminális domén hatszor erősebben köti a Ca^{2+} -t mint az N-terminális (4). A két Ca^{2+} -kötése már gyakorlatilag aktív konformációt indukál, már így is képes célfehérjéihez kötődni. Ca^{2+} -kötött állapotban hidrofób régiók kerülnek a molekula felszínére, amelyek kötőfelszín biztosítanak a célfehérjék számára, amikor a CaM a sejtben kifejti a szabályozó hatását.



2. ábra A kalmodulin apo- (1CFD) és Ca^{2+} -kötött (1CLL) állapotában. Az ábra a SwissPDBview 3.7 program segítségével készült

A Ca^{2+} -al telített CaM nagyfelbontású (1,7 Å) kristályszerkezete már több mint 20 éve ismert (2. ábra) (5). Ebben a szerkezetben a CaM konformációja jellegzetes súlyzó alakú. A két globuláris N- és C-terminális domént egy α -hélix köti össze, melyet a szekvencia 65-92 számú aminosavai alkotnak. A fehérje 8 darab α -hélixből áll, a Ca^{2+} -kötőhelyek az I-II-es, III-IV-es, V-VI-os és VII-VIII-as hélixek között találhatóak, ahol a számozás a fehérje N-terminálisától halad. Kristályban egy merev szerkezet alakul ki, a központi összekötő régió merev helikális rúdként távol tartja egymástól a két globuláris domént, így ezek között nem jöhet létre kölcsönhatás. A Ca^{2+} -kötés hatására 1-1 hidrofób zseb alakul ki az N- illetve C-terminális doménban, amelyeket savas aminosav oldalláncok szegélyeznek; ezen hidrofób régiók nagy fontossággal bírnak a célfehérjék felismerésében. A Ca^{2+} -CaM-nal ellentétben, az apo-CaM kristályosítása már nehezebb feladat volt, amelyet utóbbi évekig nem is sikerült megoldani (6), ezért a Ca^{2+} -mentes CaM-ról főleg NMR szerkezetek állnak rendelkezésre (7,8). Az apo-CaM és a Ca-CaM szerkezetét összehasonlítva látható a Ca^{2+} által indukált nagymértékű konformációváltozás, amely elsősorban CaM α -hélicei közti ún. interhelikális szögek drasztikus megváltozását jelenti. (2. ábra).

Az apo-CaM mellett kalciummal telített CaM oldatbeli szerkezetét is meghatározták már multidimenzionális NMR vizsgálatokkal (9). A globuláris doménekre vonatkozó szerkezet jó összhangban volt azzal, amit a kristályszerkezeti adatok mutattak, de a középső szakasz, akárcsak az apo-CaM esetében, flexibilisnek bizonyult. Oldatban a központi rész flexibilitásának köszönhetően a két globuláris domén relatív pozíciója nem rögzített, a CaM a zárt és nyitott konformáció között fluktuál.

Az utóbbi évek röntgenkristallográfiás és molekulamodellezési vizsgálatainak eredményeként kiderült, hogyan egyeztethetőek össze az oldatban és kristályban kapott látszólag eltérő szerkezeti eredmények (10). Ezen kutatások alapján kiderült, hogy a CaM centrális régiójában illetve a hidrofób zsebeknél található aminosavak oldaláncai nagyobb mozgékonyassággal rendelkeznek mint más régiók. Ez a flexibilitás teszi lehetővé a fehérje sokrétű célfelismerését: ennek segítségével tudja a CaM többféle célfehérjéhez adaptálni a szerkezetét.

A CaM funkciója

A Ca^{2+} az eukarióta sejtek jelátvivő folyamataiban résztvevő egyik másodlagos hírvivő (11). A sejtbeli Ca^{2+} -koncentráció külső inger hatására kiváltott növekedése sokféle válaszreakciót indít be. A citoplazma nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációja viszonylag kicsi, 10^{-7} - 10^{-8} M, amely tranziens izgalmi állapotban 10^{-6} M-ra növekedhet. A növekedés forrása az extracelluláris tér illetve a sejten belüli Ca^{2+} -raktárak (endoplazmatikus retikulum, mitokondrium, nagy kapacitású Ca^{2+} -kötő fehérjék). A Ca^{2+} -jel gerjesztése, terjedése és megállása a különböző membránszatomok, ionpumpák és receptorok együttműködésének köszönhető. Ennek eredményeként a sejt Ca^{2+} -szintje folyamatosan oszcillál. Különböző ingerek más és más frekvenciájú oszcillációkat eredményeznek, és ezáltal különböző válaszreakciót váltanak ki a sejtben. A megemelkedett Ca^{2+} -szintet, a sejt biokémiai folyamatai számára értelmezhető jellé a Ca^{2+} -kötő fehérjék alakítják. Az intracelluláris Ca^{2+} receptorok közül az eukarióta sejtekben mindenütt előforduló CaM elsődleges fontosságú. Mivel a Ca^{2+} affinitása a CaM-hoz a 10^{-6} tartományban van, így a fehérje kapcsolóként működik, amikor a sejtbeli kalciumkoncentráció a nyugalmi értékről az izgalmi értékre emelkedik. A Ca^{2+} -kötés a már említett mélyreható konformációs változásokat idézi elő a CaM fehérjében, emiatt tud különböző célfehérjékhez kötődni, és azokat aktiválni vagy gátolni. A hozzá hasonló fehérjékkel ellentétben, a CaM igen sokféle folyamatot regulál. A troponin C például csak harántcsíkolt izmokban és a szívizomban fordul elő, és kizárólag az izomműködésben van szerepe. A CaM viszont az eddigi ismereteink szerint több mint 100 célfehérjére van hatással, és ebben rejlik a nagy jelentősége (12). A CaM számtalan életfolyamatot szabályoz: szerepet játszik például az izom-összehúzódás szabályozása (13) mellett a látásban (14), valamint a sejtproliferációban (15).

Érdekes módon a CaM protein kinázokat (CaM-függő kinázokat) és protein foszfatázt (CaM-függő kalcineurin) egyaránt tud aktiválni. A multifunkcionális CaM-függő kinázok sok szubsztráttal rendelkeznek a sejt különböző részeiben, a sejtmagban, a sejtvázban, a sejtmembránban és a citoplazmában egyaránt (16). A specifikus CaM-függő

kinázok közé tartozik például a simaizom miozin könnyűlánc kináz és a foszforiláz kináz is. Hatással van a glikolízis egyik sebességmeghatározó lépését katalizáló enzim, a foszfofruktokináz működésére (17). Másodlagos jelátvivők (cAMP, nitrogén-monoxid) szintézisének, illetve lebontásának regulációjában is részt vesz, hozzájárulva ezzel a különböző jelátviteli útvonalak közti kommunikációhoz (18-20). A CaM kölcsönhat több citoskeletális fehérjével is, például MT-hoz kötött MAP-2 és tau fehérjékkel, valamint a MT-ok dinamikáját is befolyásolja (21,22). Az eukarióta transzkripció szabályozásában közvetlenül is részt vesz, kötődik egyes transzkripciós faktorokhoz és gátolja azok kölcsönhatását a DNS-el, ennél fogva, a sejtciklus szabályozásában is fontos szerepe van (23).

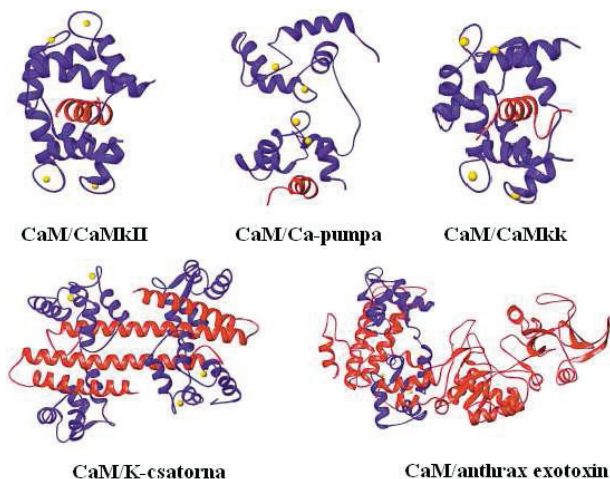
Fontos külön is kitérni az olyan CaM célfehérjékre amelyek Ca^{2+} -független módon illetve csak az apo-CaM-hoz kötődnek. Ezen kölcsönhatások funkcionális jelentősége csak néhány esetben ismert, ezen fehérjék körébe tartozik például a neuromodulin és a miozin V.

A CaM kölcsönhatása célfehérjéivel

Az, hogy hogyan képes a CaM ennyiféle fehérjével kölcsönhatni és mi az oka annak, hogy a fehérjék Ca^{2+} jelenlétében kötődnek a CaM-hoz, de a Ca^{2+} távollétében nem, intenzív kutatások tárgya volt az elmúlt években. Már több CaM-függő fehérje CaM-kötő doménjét azonosították különböző biokémiai és molekuláris biológiai módszerek segítségével (24). Az összehasonlítás során kitűnt, hogy a CaM-kötő domének szekvenciái meglepően nagy különbségeket mutatnak. Amiben hasonló az az, hogy igen sok hidrofób és bázikus aminosav fordul elő bennük, míg savas oldalláncú aminosavak gyakorlatilag nincsenek ezekben a szekvenciákban. Különböző modellpeptidek vizsgálatából kitűnt, hogy azok, amelyek különösen hajlamosak stabil α -hélix kialakítására, igen szorosan kötődnek a Ca^{2+} -CaM-hoz. Az ilyen peptidek és fehérjerészletek által kialakított, hidrofób és bázikus oldalláncokat tartalmazó hélixeket Baa-hélixnek nevezik (Bázikus amfipatikus α -hélix kezdőbetűiből). Feltételezhető volt ez alapján, hogy az igen szoros (nM-os disszociációs állandóval jellemezhető), de nem szekvencia-specifikus kötéstért a CaM-kötő domének ilyen bázikus amfipatikus hélix szerkezete tehető felelőssé (11). A nagyfokú szekvenciabeli különbségek ellenére lehetséges a CaM-kötő szekvenciák csoportosítása

(25), illetve, a még nem azonosított CaM célfehérjék jóslása (26). Ennek fényében a CaM-kötő fehérjéket négy fő csoportba lehet sorolni: ezek az 1-10, 1-14, 1-16 illetve az IQ motívumokat tartalmazó fehérjék. Az 1-10, 1-14 és 1-16 motívumok nevében a számok a nagyméretű hidrofób oldalancok (Phe, Ile, Leu, Val, Trp) relatív elhelyekedését jelzik a szekenciában. Az IQ motívum kissé eltér a másik háromtól, ebben a szekenciában a hidrofób aminosavat (amely többnyire Ile) glutamin követi majd egy bázikus aminosav illetve ismét egy hidrofób oldalanc, ez a szekvencia a CaM-nal Ca-független módon kölcsönható fehérjékre jellemző.

Számos CaM-kötő fehérje kötőrégióját szintetizálták, és meghatározták a Ca^{2+} -CaM - peptid komplex háromdimenziós szerkezetét röntgenkristallográfia és NMR segítségével. Valamennyi komplexben a CaM-kötő peptid szerkezete megfelelt a várt bázikus amfipatikus α -helikális szerkezetnek (3. ábra).



3. ábra: CaM (kék)- célpeptid/célfehérje (piros) komplexek szerkezete (27)

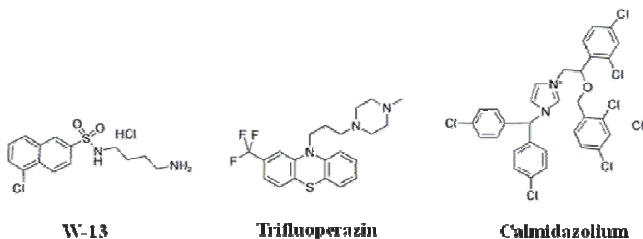
A komplexekben nagyarányú konformációváltozás figyelhető meg a célpeptid-kötés hatására: a CaM C- és N-terminális doménje a központi hélix középső régiójának

meghajlása révén jóval közelebb kerül egymáshoz, a fehérje „összecsuklik”. Ezáltal a két domén között egy olyan hidrofób és savas oldalláncokkal bélelt csatorna alakul ki, amely ideális körülményeket teremt a célpeptidek bekötődéséhez. Ezen sémát követik a 3. ábrán bemutatott CaM-függő kináz II (1-10 motívum) és a CaM-függő kinázkináz (1-16 motívum) peptidekkel képzett CaM komplexek.

A hasonlóságok ellenére az egyes komplexek szerkezete eltérő: az egyes peptidek oldalláncai különböző CaM aminosav csoportokhoz kötődnek, továbbá az N- és C-terminális domének relatív orientációja is más. A két globuláris domén relatív pozíciója függ a célpeptid típusától: a hidrofób oldalláncok közötti távolság (1-10, 1-14 vagy 1-16) határozza meg a CaM N- és C-terminális doménjainak egymáshoz képest elfoglalt helyzetét a komplexben. A flexibilis központi „póráznak” tehát nagy szerepe van abban, hogy a CaM ennyire sokféle fehérjével tud kölcsönhatni. A 8. ábrán látható másik három komplex jelentősen különbözik a legtöbb vizsgált CaM – célfehérje szerkezetétől. A CaM – Ca^{2+} pumpa CaM kötő régiójával képzett (28), illetve a CaM anthrax exotoxinnal (amely mindezidáig az egyetlen teljes méretű célfehérjével meghatározott CaM szerkezet) képzett komplexében (29), a CaM nem „csuklik össze” mint a már megismert szerkezetekben. A CaM K^{+} -csatorna peptidjével alkotott komplexe azért különleges mert ebben a szerkezetben csak a CaM C-terminális doménje van Ca^{2+} -kötött állapotban, az N-terminális domén pedig a célpeptidhez kötődik.

CaM antagonisták

Antagonistának nevezzük minden olyan vegyületet, amely egy adott fehérje hatását gátolja, illetve felfüggeszti. A CaM antagonistái különböző vegyületszerek csoportokba sorolhatók, ám valamennyiük közös jellemzője, hogy nagyméretű hidrofób (aromás) csoportokat és bázisos N-atomokat tartalmaznak és a két csoport között legalább 3 atom távolság van (30) (4. ábra). Ez nem meglepő a CaM-kötő peptidek szekvenciájának ismeretében hiszen ott is kulcsfontosságú a hidrofób és bázikus oldalláncok relatív pozíciója. Kompetitív antagonisták esetén feltehető volt, hogy az antagonista és a célenzim CaM-kötése hasonló szerkezeti alapokkal bír.



4. ábra Néhány CaM antagonisták szerkezete

Az általam vizsgált egyik klasszikus CaM antagonisták egyike a TFP. A CaM több TFP molekula megkötésére képes, kis és nagy affinitású kötőhelyekkel rendelkezik. A TFP-CaM komplex kristályszerkezete 3 független publikációból (31-33) ismert. Az egyik szerkezetben 4, a másikban 2, a harmadikban 1 TFP molekula kötődik a CaM-hoz. A TFP kötőhelyek között megkülönböztetünk intradomén és interdomén típusokat. Intradomén helyek esetén a TFP azt a savas aminosav oldalláncokkal körülvett hidrofób zsebet foglalja el a C terminális doménban, amely a célnzimek elsődleges CaM-kötő régiója, ugyanilyen intradomén kötőhely található az N-terminális doménban is. A TFP molekulák hidrofób aromás csoportjai a hidrofób zsebek felé irányulnak, a piperazin részeket pozitívan töltött N atomjai pedig a savas oldalláncokkal alakítanak ki kapcsolatot. A 4TFP-s szerkezetben két TFP a C- és N- terminális doménhoz kötődik, a másik kettő pedig mindkét doménal alakít ki kapcsolatot, ezáltal összeköttetést teremtve a két domén között (interdomén kötőhelyek). Az egy TFP-t tartalmazó szerkezetben a TFP ugyanoda kötődik, ahová a négy TFP-t tartalmazó szerkezetben a C-terminális doménhoz kötődő TFP molekula, azonban ahhoz képest 180°-al elforgatva és invertálva helyezkedik el. A kutatócsoportunkban meghatározott két TFP-s szerkezetben is az egyik TFP a C-terminális domén hidrofób zsebébe foglalja el, a másik az egyik interdomén helyre köt be, amit az első TFP bekötődése hoz létre. Ez az eredmény meglepő volt annak fényében, hogy addig a két domént a drogkötés szempontjából homológoknak tekintették. A CaM-on a komplexekben hasonló szerkezetváltozás figyelhető meg, mint a CaM-célfehérje komplex esetén. A fehérjemolekula „összecsuklásával” az N- és C- terminális domén közel kerül egymáshoz

és egy hidrofób oldalánccal borított csatornát alakít ki a bekötődő antagonistá számára. Ebben a konformációban a CaM már nem képes a célfehérjéhez kötődni, tehát a TFP kompetitív módon gátolja a CaM működését.

Korábban kutatócsoportunkban is azonosítottak új CaM antagonistá molekulákat: az egyik ilyen molekula egy aril-alkil-amin származék, amely a többi antagonistához képest jóval erősebben (nM-os K_d) kötődik CaM-hoz (34). Ugyancsak ebbe a vegyületcsoportba tartozik a szintén csoportunkban azonosított KHL-8430 jelű molekula is amely a CaM-célfehérje komplexhez kötődik és így feje ki antagonistá hatását (35). Ezt a mechanizmust nevezik funkcionális antagonizmusnak.

Az eukarióta sejt mikrotubuláris hálózata

Az eukarióta sejt fontos szerkezeti eleme az intracelluláris váz. Három, különböző típusú rendszer alkotja az intracelluláris vázat: az aktinváz, az intermedier filamentumok valamint a mikrotubuláris hálózat.

A MT-ok 24 nm átmérőjű csövek, amelyek α - és β -tubulinból álló tubulindimerek polimerizációjával keletkeznek. A polimerizáció során egy dimer α alegysége egy másik dimer β alegységéhez kötődik, illetve fordítva; 13 így felépülő protofilament egymáshoz laterálisan kötődve alakítja ki a MT-t (36). A polimerizációhoz szükséges, hogy a beépülő dimerek GTP-kötött állapotban legyenek. A tubulin dimerek fej-láb (α - β) orientációja miatt egy adott MT két vége különböző: az egyik végét α -, a másikat β -tubulin alegységek borítják. Ennek következtében az MT növekedéséhez szükséges kritikus tubulinkoncentráció különböző a cső két végén: a β alegységgel borított vég esetén alacsonyabb (+ vég), az α alegységgel borított vég esetén (- vég) pedig magasabb. Mindezen folyamatok eredményeként az eukarióta sejtek mikrotubuláris hálózata egy állandóan változó, dinamikus rendszer, amelyet a sejt a tubulindimer lokális koncentrációjának változtatásával tud szabályozni (37).

Az eukarióta sejtben a mikrotubuláris hálózat szervezését a MT organizáló centrumok végzik. Állati sejtekben a legfőbb ilyen centrum a sejt központ. Ezekbe a sejtszervekbe a MT-ok a – végükkel ágyazódnak be, ennek köszönhetően a – végek védve vannak a depolimerizációtól (38). A sejt központban több más fehérje mellett γ -tubulin

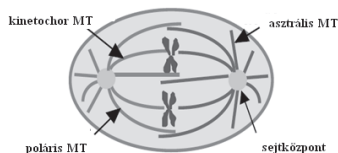
található, ehhez kötődnek a MT-ok – végei (39). Fontos megemlíteni, hogy bizonyos sejttípusokban a sejtközpont mellett a csillók bazális testjei is MT organizáló funkcióval rendelkeznek (38).

A fenti tényezőkön kívül, a sejt számos más módon is szabályozza a mikrotubuláris hálózat dinamikáját. A MT asszociált fehérjék (MAP-ek) a mikrotubuláris hálózathoz kötődve fejtik ki hatásukat. Egyik típusuk a strukturális MAP-ek; ezen fehérjék szorosan kötődnek a MT-hoz és stabilizálják azt, valamint keresztkötéseket is képesek létrehozni; két legismertebb képviselőjük a MAP2 illetve a tau fehérjék (40).

Egy másik csoportba az ún. motorfehérjék tartoznak. Ezek a fehérjék képesek ATP felhasználásával a MT-on mozogni, és ezáltal, más fehérjéket vagy vezikulákat szállítani. Két nagy családjuk ismeretes: dineinek és a kinezinek, előbbieket többnyire -, az utóbbiakat + irányba képesek haladni a MT-on (41).

A harmadik csoportba MT-hoz dinamikusan kötődő fehérjék tartoznak. Ezen fehérjék kicserélődési sebessége jóval nagyobb a strukturális MAP-ekre jellemzőnél. Ide tartoznak az olyan citoszolikus fehérjék amelyek bizonyos körülmények között a MT-on találhatók. Ezen fehérjékre példa az általam is vizsgált TPPP/p25 (42), a CaM (43), valamint egyes glikolitikus enzimek (44).

Interfázikus sejtben a mikrotubuláris hálózat legfőbb feladata a sejt belső rendezettségének, a sejszervek helyzetének, illetve a sejt alakjának fenntartása. Kulcsfontosságú szerep hárul a MT-okra a sejtosztódás során (5. ábra). A centroszómákból kiinduló kinetochor illetve poláris MT-ok végzik a testvérkromatidák szétválasztását az anafázis során, az ugyaninnen kiinduló asztrális MT pedig a centroszómák térbeli rögzítésért felelősek. A sejtosztódásban betöltött szerepe miatt számos antimitotikus hatású vegyület célpontja a mikrotubuláris hálózat (Lásd lentebb).

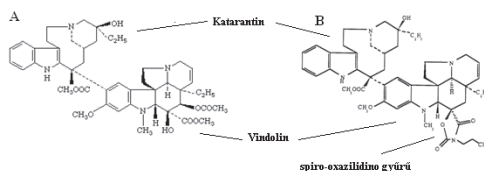


5.ábra A mikrotubuláris hálózat szerepe a mitózisban

Vinca alkaloidok és biológiai hatásuk; a KAR-2

A vinca alkaloidokat széleskörűen használják a kemoterápiában sejtosztódásgátló hatásuk miatt. Legismertebb képviselőik a vinblasztin (6/A ábra) és a vinkrisztin. Mindkét vegyület a *Vinca roseus* nevű növényben termelődik, és innen izolálják (45), illetve szintetikus úton állítják elő (46). A vinblasztin és a vinkrisztin a dimer vinca alkaloidok közé tartoznak, mivel egy katarantin és egy vindolin régióból állnak, ezen molekulák önmagukban is előfordulnak a természetben.

A vinca alkaloidok célpontja a sejt mikrotubuláris hálózata. Mint ahogy korábban kitértem rá, a mikrotubuláris hálózat kulcsfontosságú a sejtosztódás lefolyásában. A MT dinamikájának megzavarásával a sejtosztódás gátolható.



6. ábra A vinblasztin(A) és a KAR-2 (B) szerkezete.

Szubsztöchiometrikus koncentrációban alkalmazva a drogokat, felfüggesztik a mikrotubuláris rendszer dinamikus viselkedését *in vivo*. Ebben az esetben a drogok csak a MT szálak végeihez kötődnek, azon belül is a β -tubulin ún. vinca kötőhelyére (47). Nagyobb drogkoncentráció esetén a MT-k falába kötődve a vinblasztin/vinkrisztin destabilizálja a szálakat (48). A destabilizáció hatására a MT-k depolimerizálnak, illetve a tubulin dimerek ún. parakristályokká aggregálódnak, természetesen ez a folyamat is a sejt pusztulásához vezet. Érdekes, hogy a tubulinpolimerizációt indukáló taxol alkaloid alacsony koncentrációban ugyanolyan hatással van a MT dinamikára *in vivo* mint amikor a vinblasztin szubsztöchiometrikus mennyiségben van jelen (49). Ez a molekula ugyancsak citosztatikus hatással rendelkezik és elterjedten használják a kemoterápiában.

Jelenleg is számos kutatás tárgya, hogy a természetes vinca alkaloidok szintetikus módosításával olyan vegyületeket állítsanak elő, amelyek enyhébb nemkívánatos

mellékhatásokat okoznak, sejtosztódásgátló hatásuk viszont megmarad (50). Az egyik ilyen ígéretes molekula a KAR-2 (8/B ábra), amelyet a Richter Gedeon NyRt. kutatói az Enzimológia Intézetrel együttműködve állítottak elő és választottak ki, mint ígéretes antimitotikus ágenszt (51). A vinblasztin és a KAR-2 közötti fő szerkezeti különbség a vindolin régióra épített spiro-oxazilidino gyűrű.

In vitro vizsgálatok során a KAR-2 vinblasztinnal azonos mértékben gátolta a tubulin polimerizációt. Tumorelles hatását állatkísérletekkel igazolták Erlich ascites karcinóma sejtekkel beoltott egereken (52). Ezekben a kísérletekben bebizonyosodott, hogy a KAR-2 ugyanolyan hatékony antimitotikus vegyület, mint az anyamolekulája. Ugyanakkor, az állatok jóval magasabb dózist toleráltak, mint a vinblasztin esetén: a félhalálos dózis (LD_{50}) két nagyságrenddel nagyobb a KAR-2 esetén, mint a természetes vinca-alkaloidoknál. Ez arra utal, hogy a KAR-2 kevésbé toxikus az egészséges sejtekre. További, neuroblasztóma sejteken (SH-SY-5Y) végzett vizsgálatok során kiderült, hogy amíg a vinblasztin és a vinkrisztin részlegesen felfüggesztik a sejtciklust a G_0/G_1 illetve a G_2/M fázisban, a KAR-2 szelektíven a G_2/M fázisban okoz gátlást (53). Ugyancsak ebben a vizsgálatban azt találták, hogy a KAR-2 szelektíven a mitotikus orsót célozza, ezáltal gátolva a sejtosztódást, ellentétben a vinblasztinnal, amely az interfázisus mikrotubuláris hálózatot is tönkretesz. Ez utóbbi eredményt nemrég HeLa és Caco-2 sejtekben is sikerült reprodukálni (54,55).

A vinca alkaloidok mellékhatásainak két fő oka lehet, egyrészt a drogok nemcsak a az osztódó, hanem az interfázisban lévő sejtekre is hatnak; másrészt feltehető, hogy ezek a molekulák nemcsak tubulinhoz kötődnek a sejtekben, hanem más fehérjékhez is. Egy ilyen potenciális célfehérje lehet a Ca^{2+} -jeltovábbító CaM. Kutatócsoportunkban korábban kimutatták, hogy a vinblasztin és a vinkrisztin a tubulin mellett a CaM-hoz is kötődik, és antagonistaként viselkedve gátolja annak működését (56). Fluoreszcencia és CD spektroszkópiás módszerekkel már igazolták, hogy a KAR-2 is kötődik a CaM-hoz, a disszociáció egyensúlyi állandója μM –os nagyságrendű, ami hasonló a természetes eredetű bisz-indol származékok kötődési erősségéhez (57). A hasonló erősségű kötődés ellenére PFK-val végzett funkcionális vizsgálatokban a KAR-2 nem viselkedett antagonistaként (57). Mindezek fényében felvetődik tehát a kérdés hogy milyen mechanizmussal kötődik a CaM-hoz.

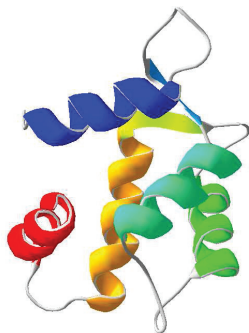
A TPPP fehérjecsalád

A TPPP/p25 fehérjét (akkor még p25a néven) 1991-ben, egy tau kináz izolálása során fedezték fel (58). Később ugyanez a csoport kimutatta, hogy a fehérje specifikusan oligodendroglia sejtekben van jelen (59). Néhány évvel később az Enzimológiai Intézet Ovádi csoportjában izoláltak egy, a marhagy extraktumban található faktort, amely tubulin polimerizációt indukált *in vitro*. Tömegspektroszkópia segítségével azonosították, kiderült, hogy a korábban p25a néven leírt fehérjével azonos (42). Elektronmikroszkópiás vizsgálatok során látható volt, hogy a marhaagyból izolált fehérje képes a tubulin polimerizációját indukálni aberráns és normális MT-sá. Azért hogy a megkülönböztessük más 25 kDa tömegű fehérjéktől, kutatócsoportunk a Tubulin Polymerization Promoting Protein nevet javasolta az új fehérjének, amely elnevezés azóta már széleskörűen elfogadottá vált (42).

A TPPP/p25 szekvenciája nem mutat homológiát más ismert fehérjékkel. A humán genom megfejtésének köszönhetően lehetővé vált eddig még nem izolált, hipotetikus fehérjék jöslása, csoportunkban így azonosítottak két, TPPP/p25-el homológ 170 illetve 176 aminosav hosszúságú fehérjét, amelyek a TPPP/p18 és a TPPP/p20 nevet kapták; ezeket (illetve később a TPPP/p25-t is) rekombináns technikával állítjuk elő a kutatócsoportunkban folyó biokémiai vizsgálatokhoz.

Szerkezetét tekintve a TPPP/p25 rendezetlen fehérjének tekinthető, ezt több különböző spektroszkópiás (CD, NMR, fluoreszcencia) módszerrel is igazoltuk. (60). A rendezetlen szerkezetet jósló PONDR (61) program szerint a fehérje N-terminális régiója (1-40 aminosavak) valamint C-terminálisa (140-218 aminosavak) nem rendelkezik jól meghatározott szerkezettel.

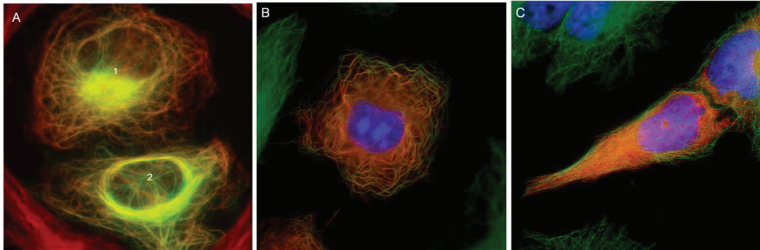
A homológ fehérjék szerkezetvizsgálata során kiderült, hogy azokban kisebb mértékű a rendezetlenség, ennek elsősorban az az oka, hogy a p18 és p20 fehérjékből hiányzik a p25-ben meglévő 40 aminosav hosszúságú N-terminális szakasz.



7. ábra A humán TPPP/p20 6-101 közötti szakaszának NMR-el meghatározott 3 dimenziós szerkezete (PDB kód: 2JRF) Színezés: N-terminális kék, C-terminális piros. Az ábra a SwissPDBview 3.7 program segítségével készült

A tavalyi év folyamán a fehérjeszerkezet adatbankban (www.pdb.org) hozzáférhetővé vált a humán TPPP/p20 NMR szerkezete (2JRF). A szerkezetből megállapítható hogy a fehérje 6-101 aminosavak közötti régiója rendezettséget mutat, 4 darab α -hélix található benne, amelyet hurkok kötnek össze (7. ábra). Ez a régió nagymértékben homológ mind a marha, mind a humán TPPP/p25 46-140 közötti régiójával (71 % azonos, 88 % -ban hasonló, BLAST illesztés alapján (62)). Ez alapján feltehető, hogy a TPPP/p25 is rendelkezik egy a p20-hoz hasonló rendezett „maggal”.

A TPPP/p25 *in vivo* hatását több rendszerben is vizsgáltuk. *Drosophila* embrióba injektálva szelektíven gátolja a sejtosztódást, megakadályozza a mitotikus orsó felépülését (63). A fehérje és a mikrotubuláris hálózat kölcsönhatását *in vivo* is igazolta a kutatócsoportunk. TPPP/p25 – EGFP génkonstrukcióval tranziensen transzfektált HeLa sejtekben (64). A transzfektált sejtek a fehérje kifejeződésének mértékétől függően szenvednek változásokat a HeLa sejtekben (8. ábra). Alacsony expressziós szint esetén a sejt és a mikrotubuláris hálózat ultrastruktúrája nem változik, a sejtek osztódni is képesek.



8. ábra: EGFP-TPPP/p25 (A), DsRed-p20 (B) és DsRed-p18 (C) eloszlása transziensen transzfektált HeLa sejtekben. A TPPP/p25 túltermelés hatására megjelenő két fenotípus: 1: aggreszóma, 2: „ketrec” (64)

Ezzel szemben, ha magasabb a fehérje mennyisége, kétfajta fenotípus jelenik meg: az egyikben a TPPP/p25 a sejtmag közelében, a centroszóma körül dúsul fel ún. aggreszómát létrehozva. A másik esetben a mikrotubuláris hálózat változik meg: ketrecszerűen körülvéshi a sejtmagot. A fehérjét kifejező HeLa sejtek vizsgálata során az is kiderült, hogy a TPPP/p25 megvédi a mikrotubuláris hálózatot a vinblasztin depolimerizáló hatásával szemben (64). A homológok *in vivo* eloszlását vizsgálva azt találtuk, hogy a p20 hasonlóan a p25-höz a mikrotubuláris hálózattal kolokalizál de a p25-nél nagyobb mértékű kötegelést okoz, ezzel ellentétben a p18 homogén eloszlást mutat HeLa sejtekben (65).

Kutatócsoportunk egyik fontos eredménye volt TPPP fehérjék tubulinnal való kölcsönhatásának jellemzése, ezen vizsgálatokba én is bekapcsolódtam. CD spektroszkópiával és SPR segítségével vizsgáltuk a TPPP fehérjék affinitását tubulinhoz. Mindkét módszerrel a p18<p20<p25 irányban nőtt a kötési erősség (65). A tubulinon kívül számos más kölcsönható partnert sikerült azonosítani immunoprecipitációs, affinitáskromatográfiás és proteomikai módszerek kombinálásával. Ezen fehérjék között van számos protein kináz: ERK2, Protein kináz A és C, LIM kináz; szinaptikus fehérjék: komplexin, szinapszin, α -szinuklein, valamint a dolgozatomban témáját is képező CaM. Az általam karakterizált (lásd: Eredmények és kiértékelésük fejezet) CaM – TPPP/p25 közötti kölcsönhatást affinitáskromatográfiát követő tömegspektrometriás azonosítással igazolták (66).

A TPPP/p25 szelektív felhalmozódását kimutatták humán patológiás mintákban, amelyek Parkinson-kóros és más szinukleinopátiás betegek agyából származtak. Ezekben a

mintákban a TPPP/p25 mind a gliális mind pedig a neuronális zárványtestekben halmozódott fel és α -szinukleinnel kolokalizálódott. (60). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a fehérje szinukleinopátiás betegségek egy új markere. Feltételezhető hogy a HeLa sejtekben TPPP/p25 túltermelés hatására megjelenő aggrozóma analóg a patológias agyszövetekben található zárványtesttel.

Időközben kutatócsoportunkban sikerült patkány oligodendrocita sejtvonalban (CG-4) endogén TPPP/p25 jelenlétét. A fehérje expressziós szintje a sejtek differenciációs állapotától függ: a multipotens pre-oligodendroglia sejtekben alacsony a fehérje mennyisége, míg a differenciálódott sejtekben többszörösére növekszik (54). Ez összhangban van egy korábbi kutatás eredményével, amelyben azt találták, hogy a TPPP/p25 nem expresszálódik neoplasztikus, tehát gyorsan osztódó neuronális sejtekben, csakis egészségesekben (67). Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a TPPP/p25 valószínűleg részt vesz a sejtciklus szabályozásában is.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Fehérjék és vegyszerek

A munkám során használt fehérjéket és vegyszereket a Sigma-Aldrich magyarországi kirendeltségétől rendeltem, az ettől eltérő forrásokat a szövegben külön jeleztem.

CaM izolálása marhaagyból

A CaM-t marhaagyból izoláltam, egy korábban már publikált és széleskörűen alkalmazott eljárással (68). A tisztítás a CaM azon tulajdonságát használja ki miszerint fenil-szefaróz oszlopra Ca^{2+} függő módon kötődik, és ennek következtében onnan EGTA-val szelektíven eluálható.

^{15}N -el jelölt rekombináns CaM izolálása

Az NMR mérésekhez ^{15}N -el jelölt CaM-ra volt szükség, ezekre a mérésekre a marhaagyból izolált CaM alkalmatlan, ezért a fehérjét *E. coliban* ^{15}N -t tartalmazó táptalajon termeltettem. A fehérje termeltetéséhez pet21d vektorba klónozott CaM-t használtam. A Chicken gizzard CaM pet21d génkonstrukcióhoz Akio Nakamura (Gunma Egyetem, Japán) révén jutottunk. A transzformált BL21 pLysS baktériumokkal minimál táptalajon (1 literben: 5 g glükóz, 3 g KH_2PO_4 , 1 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 0,5 g NaCl, 0,12 g MgSO_4 , 0,01 g CaCl_2) termeltettem az ^{15}N -el jelölt CaM-t. Amint a sejtszám elérte megfelelő értékét, vagyis a 600 nm-en mért abszorbancia nagyobb mint 0,6, az expressziót IPTG hozzáadásával indítjuk meg, végkoncentrációja 1 mM. 3 óra termeltetés után centrifugacsövekbe vittem át őket és 15 percig 6000 g-vel centrifugáltam, majd a felülúszót

eldobtam. A leülepedett sejteket 100 ml hideg ultratiszta vízzel mostam, majd újabb centrifugálás következik 15 percig 6000 g-n. A felülúszót ismét kiöntöttem. Az így megtisztított sejteket felfuszpendáltam 20 ml TE pufferben (TE puffer: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH = 7,8). A sejtet oldatot ultrahangos homogenizátorral kezeltem 6 percig jeges hűtés mellett. A homogenizátumot 100 000 g-vel 60 percig 4 °C-on centrifugáltam. A centrifugálás után a felülúszót tartottam meg, térfogatát 50 ml-re állítottam TE pufferrel, majd hozzáadtam 3 ml 50%-os TCA-t és tíz percig kevertettem hidegszobában, utána pedig a pH-ját 6 M NaOH oldattal 5,2-re állítottam. Az ekkor kicsapódó fehérjék között még nincs ott a CaM, mivel izoelektromos pontja 4,3. 100 µl 0,5 M EDTA és 50 µl 0,1 M PMSF hozzáadása után harminc percig jégbe hűtve állni hagyjuk, majd 5000 g-n 45 percig centrifugáljuk. Ezúttal is felülúszóra volt szükség, hozzáadtam 3 ml 50% TCA-t és 45 percig ismét állni hagytam. Ilyen körülmények között a CaM már kicsapódik, ezért a következő centrifugálásnál (20000 g, 15 perc) már a felülúszót dobtam el és a csapadékot oldottam fel 2 ml 1,5 M TRIS pufferben, amelynek azután térfogatát TE pufferrel 100 ml – re egészítettem ki. Ezután hozzáadunk 100 µl 0,5 M EDTA-t és 50 µl 0,1 M PMSF-et, majd 30 g (NH₄)₂SO₄-ot és 30 percig jeges hűtés mellett kevertettem. Az ammónium-szulfáttal kicsaptam a még a CaM mellett lévő egyéb fehérjéket, de a CaM-t nem, mert ahhoz nagyobb ionerősség, tehát nagyobb sókoncentráció szükséges. A centrifugálás után (20000 g, 15 perc) a felülúszóhoz a leválasztás után 4 ml 50 % TCA-t adtam hidegszobában, folyamatos kevertetés közben. Ezzel a savanyítási lépéssel ismét elértem a CaM izoelektromos pontját, tehát az kicsapódik az oldatból, amelytől egy utolsó centrifugálási lépésben elválasztottam (20000 g, 30 perc). A kiülepedett csapadékot TRIS pufferben (10 mM TRIS, 10 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 3 mM NaN₃, pH = 8,0) oldottam fel és további felhasználásig -20 °C-on fagyaszttva tároltam. A minta tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem.

TPPP/p25 izolálása marhaagyból

A *Bos bovis* TPPP/p25 izolálását egy, a csoportunkban kidolgozott módszerrel végeztem, az eljárás már publikálásra került, ezért csak rövid közlésére szorítkozom (42). A marhaagyat a CaM izolálásánál már leírt módon homogenizáltam, majd a homogenizátumot hősokknak vettem alá mivel a TPPP/p25 hőstabil fehérje. A hősokkolt marhaagy extrakt felülúszóját tovább tisztítottam A50 és P11 ioncserélő gyantákon, majd a preparálás utolsó lépésében a mintát kationcserélő oszlopra (Fractogel® EMD SO_3^- - 650(S), Merck) vittem. A TPPP/p25 kötődik az oszlopra, lineáris sógradienst alkalmazva, a fehérje 0,5 és 0,8 M NaCl koncentráció között eluálható. A TPPP/p25 –t tartalmazó frakciókat 50 mM ammónium-acetát oldatba dializáltam át majd liofilizáltam. Az izolált fehérje tisztaságát SDS poli-akrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem.

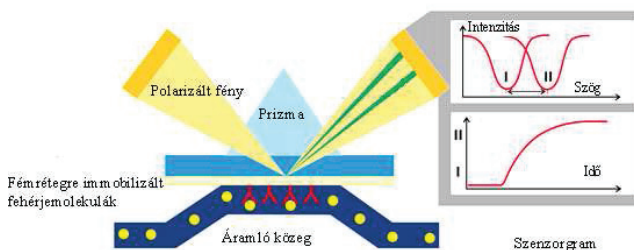
CaM biotinilálása

A CaM bitonilálását egy korábban már leírt módszerrel végeztem (69). Ezen eljárással a két globuláris domént összekötő régióban található 75 és 77-es lizint lehet biotinilálni. Erre azért van szükség, mert így módon a sztreptavidin felszínre rögzített fehérje megőrzi a flexibilitását: képes Ca^{2+} -függő módon a célfehérjéjéhez kötődni. A CaM-ból 1 mg/ml-es oldatot készítettem 25 mM HEPES pufferben, amely 1 mM CaCl_2 -t és 100 mM KCl-t tartalmazott. A biotiniláló reagens (Biotin-XX-SSE, Molecular Probes) koncentrációja 268 $\mu\text{g/ml}$ volt. Az elegyet 2 órán át kevertettem hidegszobában, majd 36 órán át dializáltam 50 mM TRIS, 1 mM CaCl_2 , 100 mM KCl összetételű pufferben.

Felületi plazmon rezonancia mérések

A felületi plazmon rezonancián alapuló eljárás alkalmas biomolekulák kölcsönhatásának követésére. A módszer fizikai alapja, hogy egy fém-folyadék határfelületre polarizált fényt bocsátva felületi plazmon-hullámok keletkeznek, amelyek

adott hullámhossz és beesési szög kombinációknál csökkentik a visszavert fény intenzitását, amit a fémréteg felőli oldalon elhelyezett optikai rendszer folyamatosan regisztrál. Az interferencia függ a folyadékréteg törésmutatójától, ami megváltozik, ha a felszínhez makromolekulák kötődnek. Az optikai rendszer által szolgáltatott relatív jel, az ún. „response unit” (RU) nagysága egyenesen arányos a felülethez kötődött anyag tömegével.



9. ábra. A Biacore optikai rendszere

A Biacore X készülék esetén, amelyet kísérleteimhez használtam, a mintát egy ún. „chipen” vezetjük keresztül, amely egy vékony aranyréteg, egyik oldalán biomolekulák kötésére kialakított felülettel (9. ábra). Ez a felület a chip típusától függően van kialakítva. A munkám során SA típusú chipeket használtam, amely sztreptavidinnel borított felszínnel rendelkezik és biotinnal jelölt fehérjék kötésére alkalmas, ezt a módszert alkalmaztam a CaM immobilizálására.

Ha a felszín felett olyan fehérjét áramoltatunk, amelyek kötődnek a felszínre immobilizált molekulákhoz, akkor egy folyamatosan növekedő jelet kapunk (asszociációs fázis), ha ezt megszüntetjük és csak pufferrel mossuk a felszínt akkor csökkenő jelet (disszociációs fázis) mérhetünk: A két görbe alakjából nemlineáris paraméterbecslés segítségével meghatározhatóak a kölcsönhatás kinetikai (k_a , k_d) paraméterei. Az illesztésből ugyancsak meghatározható hogy a felszínen mennyi kötőhely található (R_{max}) valamint hogy adott koncentrációnál mennyi makromolekulát képes megkötni (R_{eq} vagy egyensúlyi

telítettség).

Az SA chipet immobilizálás előtt háromszor 20 μ l 1 M NaCl és 5 mM NaOH elegyével aktiváltam. A biotinizált fehérjét 50 μ g/ml koncentrációban injektáltam a felületre 5 μ l/min áramlási sebességnél és addig hagytam áramlani felette, amíg kb. 1000 RU (~1 ng) jele növekedést el nem értem.

A CaM-nal bevont chip esetén az áramlási sebesség minden mérésnél 10 μ l/min volt, egy mérés alkalmával 50 μ l-t injektáltam. Eluensnek 50 mM HEPES puffert használtam, amely 100 mM KCl-t, 100 μ M CaCl_2 -t, 5 mM MgCl_2 -t és 0,005 % P20 detergenst (Biacore AB, Uppsala, Svédország) tartalmazott. Két mérés között 50 mM-os EGTA oldat injektálásával regeneráltam a CaM felszínt. Az EGTA megköti az oldatban lévő Ca^{2+} -t, ezáltal a CaM is elveszíti Ca^{2+} -tartalmát és így már nem képes kötödni a célfehérjéhez. Mivel TPPP/p25 esetén a kölcsönhatás Ca^{2+} -függetlennek mutatkozott, az EGTA-s regenerálás hatástalan volt, így ezeknél a méréseknél 0,1 M HCl -al regeneráltam a felszínt. Valamennyi mérést párhuzamosan két csatornán végeztem. Az elsőben az immobilizált CaM, a második, referencia csatornában csupasz sztreptavidin felszín volt, ez utóbbi jelet a készülék automatikusan levonta az első csatornán mért jelből, kiküszöbölve ezzel a nonspecifikus kölcsönhatások okozta kötődést. A görbék kiértékeléséhez a műszerhez mellékelt BiaEvaluation 3.0 szoftvert használtam.

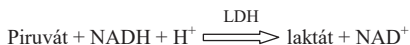
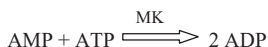
CD spektroszkópia

A CD spektrumokat JASCO J-720 spektropolariméter segítségével vettem fel. A méréseket 25 °C-on 10 mM Tris pH = 7,0 pufferben, 200 μ M CaCl_2 mellett végeztem 1 cm-es küvetében. A spektrumokat 5 perc inkubálási idő után vettem fel. A 3 komponensű elegyek esetén az egyes összetevők hozzáadási sorrendje nem volt hatással a spektrumra. CaM nélkül a drogok nem voltak optikailag aktívak. A spektrumokon végzett matematikai műveleteket a készülékhez tartozó Standard Analysis szoftverrel végeztem.

PDE aktivitás mérés

A PDE aktivitását csatolt enzimrendszeren végeztem három drog – TFP, vinblasztin, KAR-2 - különböző koncentrációi mellett, valamint CaM-nal és nélküle (70).

A reakció lépései:



A mérést 66 mM TRIS pufferben végeztem, amely tartalmazott még 54 mM KCl-t, 6,4 mM MgCl₂-t és 0,03 mM CaCl₂-t, pH= 7,5. A szubsztátok koncentrációi: PEP: 0,6 mM ; ATP: 0,3 mM; cAMP: 1,2 mM; NADH: 0,1 mM. Enzimek (U=UNIT 1 U enzim 1 perc alatt 1 μmol szubsztátot képes átalakítani): PDE: 0,01 U (4 nM); MK: 60 U; PK: 11 U ; LDH: 16 U. A CaM koncentrációja 20 nM volt.

A reakciót Cary 100 (Varian) termosztálható UV fotométerrel követtem 340 nm-en. A reakcióelegy végtérfogata 640 μl volt. A reakciót a PDE hozzáadásával indítottam el 5 perces inkubálási idő után. A méréseket 30 °C-on végeztem.

Fehérjekristályosítás

A CaM-KAR-2 kristályosítását függőcsepp módszerrel végeztem 24 lyukú kristályosító tálcán. Összesen 24 körülményt teszteltem, a kristályosításhoz 1 mM CaM és ekvimoláris mennyiségű KAR-2-t használtam 10 mM HEPES (pH = 7,0) pufferben 5 mM CaCl₂ jelenlétében. A vizsgált körülményekben a pH-t 4,6 és 4,8 között változtattam,

kicsapószernek pedig PEG8000-et vagy PEG4000-et használtam a 26-32%-os koncentrációtartományban. A kristályt eredményező körülménynél a kristályosítóoldat 50 mM Na-kakodilátot, (pH = 4,7) 26% (w/v)-os PEG8000-t, 5 mM CaCl_2 -t és 10 mM MgCl_2 -t tartalmazott. A függő csepp 2 μl fehérje oldatot és 2 μl rezervoár oldatot tartalmazott. A kristály lefagyasztásához használt kriooldat a kristályosítóoldatot és 15 % glicerint tartalmazott.

Kristályszerkezet-meghatározás

A röntgendiffrakciós méréseket Dr. Harmat Veronika (ELTE TTK Kémia Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium) végezte Hamburgban a DESY szinkrotron EMBL X11 sugármalájában. Az egykristályról 75° és 120°-os elforgatás közben (oszillációs szög 0,4° illetve 0,1°) készültek felvételek. A reflexiók indexelését valamint a térsoport meghatározást az XDS (71) program segítségével Dr. Harmat Veronika végezte.

A szerkezet meghatározását molekuláris helyettesítéssel végeztük, ehhez a CCP4 programcsomag (72) MOLREP programját használtuk. A molekuláris helyettesítés során a keresési modell a CaM-4TFP (PDB kód: 1LIN) poli-alaninná csonkolt C- terminális doménje volt. A végső szerkezetet modellépítési és szerkezetfinomítási lépések váltakozó alkalmazásával értem el. A szerkezet finomításához a REFMAC5 programot (73), modellépítéshez az O programot (74), a szerkezeti vízmolekulák azonosításához pedig az ARP (75) szoftvert használtam. A végső szerkezet sztereokémiáját a PROCHECK (76) programmal ellenőriztem. Az atomi koordinátákat illetve az egyéb szerkezeti adatokat elhelyeztem a fehérjeszerkezet adatbankban (Protein Data Bank) az 1XA5 hozzáférési kód alatt.

NMR spektroszkópia

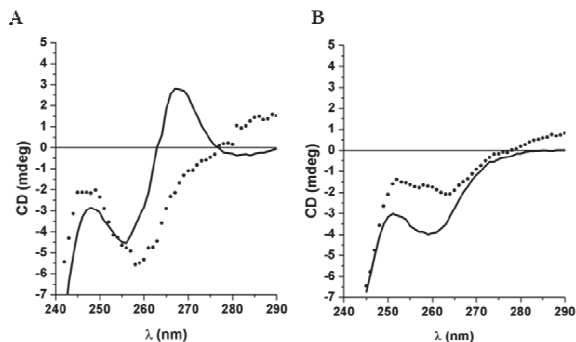
A megtisztított, ^{15}N -el jelzett CaM-t a mérés előtt TRIS pufferből dialízissal egy puffer nélküli oldatba vittem át, amely 6,2 mM CaCl_2 -t, 100 mM KCl-t, 7 % D_2O -t és 0,01 % Na_3P -t tartalmazott. A CaM koncentrációja 1 mM volt. A mérés során a CaM-hoz 35 mM-os KAR-2 oldatot adagoltunk 4, 8 12, 16 és 24 μl mennyiségben. 16 μl -nél a drog és a

fehérje ekvivalens mennyiségben volt jelen. A méréseket Dr. Perczel András végezte az ELTE TTK Kémia Intézet NMR laboratóriumában. Elsőként a tiszta CaM ^{15}N - ^1H HSQC spektrumát vettük fel majd ugyanezt tettük minden egyes titrálási lépésnél. Az utolsó adag KAR-2 hozzáadása után HSQC-TCS és HSQC-NOE spektrumok felvételére került sor. A spektrumok asszignációját Pálfi Villó végezte (ELTE TTK, Kémia Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium).

EREDMÉNYEK

CD spektroszkópia

A fehérjéken bekövetkező szerkezeti változások jól követhetők CD spektroszkópiával. Míg a távoli UV tartományban (250 nm alatt) a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeit lehet tanulmányozni, addig a közeli UV tartományban (250 nm fölött) a harmadlagos szerkezeti változásokat lehet jól nyomon követni. CD spektroszkópiás méréseim során vizsgáltam a CaM antagonistá TFP illetve két vinca alkaloid a KAR-2, és anyamolekulája a vinblasztin által a CaM fehérjében okozott szerkezeti változásokat. Csoportunk egy korábbi publikációjában leírta, hogy az első illetve második TFP molekula egymást követően kötődik a CaM-hoz és két különböző csúcsot eredményez a CaM CD spektrumában a közeli UV tartományban (77). Az első TFP molekula bekötődése 255 nm-nél egy negatív csúcsot eredményez, míg a második egy pozitív csúcsot 270 nm-nél. Röntgenkristallográfiás adatokkal összevetve, azonosítható, hogy az első bekötődő TFP a CaM C-terminális hidrofób zsebébe kötődik, a második TFP pedig az első által indukált konformációs változás által kialakított kötőhelyen található a fehérjén.



10. ábra KAR-2 és vinblasztin hatása a CaM-TFP komplexekre: **A**, 10 μ M CaM és 30 μ M TFP differencia CD spektruma KAR-2 nélkül (kihúzott vonal) illetve 30 μ M KAR-2 mellett (pontozott vonal). **B**, 10 μ M CaM és 10 μ M TFP differencia CD spektruma vinblasztin nélkül (kihúzott vonal) illetve 10 μ M vinblasztin jelenlétében (pontozott vonal).

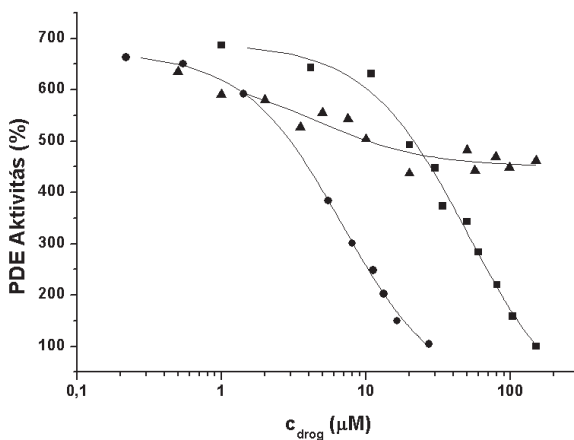
Méréseim során a CaM-hoz háromszoros feleslegben TFP-t adva megkaptam a várt két csúcst a differenciaspektrumban. A háromszoros TFP felesleg miatt az első két TFP kötőhely biztosan telítve van. Ehhez az elegyhez KAR-2-t adva a 270 nm-en lévő csúc eltűnik, ugyanakkor, ha a CaM:TFP 1:1 arányú elegyéhez ekvimoláris mennyiségű vinblasztint adtam akkor a 255 nm-nél található csúc tűnt el (10. ábra).

A mérések alapján megállapítható hogy mindkét vinca alkaloid kölcsönhat a CaM-nal, kötőhelyük azonban különböző. A bekötődő vinblasztin leszorítja az első helyre bekötődött TFP-t a CaM-ról, tehát valószínűsíthető, hogy kötőhelyük átfed. Ezzel ellentétben a KAR-2, a második, interdomén kötőhelyről szorítja le a TFP-t, tehát a KAR-2 kötőhelye feltehetőleg interdomén pozícióban található.

Funkcionális vizsgálatok PDE aktivitásméréssel

Csoportunk egy korábbi vizsgálatában az találták, hogy a természetes vinca alkaloidok több tesztben is CaM antagonistá hatást mutatnak (56,57) Meglepő módon a KAR-2 ezekben a rendszerekben nem viselkedett antagonistaként. Az antagonistá hatás

további vizsgálatának céljából az általam vizsgált két vinca alkaloid, a vinblasztin és a KAR-2 és a már ismert antagonista TFP CaM gátló hatását PDE aktivitásméréssel teszteltem. A PDE egy CaM által aktivált enzim, amely a másodlagos hírvívő cAMP hidrolízisét végzi. A CaM-nal mért PDE aktivitás - ahogy az várható volt - kb. 7-szerese volt az alap PDE aktivitásnak. A három drog (TFP, vinblasztin, KAR-2) különböző koncentrációi mellett mértem a PDE által katalizált reakció sebességét. A mérés során a 340 nm-en jelet adó NADH fogyását követtem, a görbe meredekségéből számoolható a PDE aktivitás.

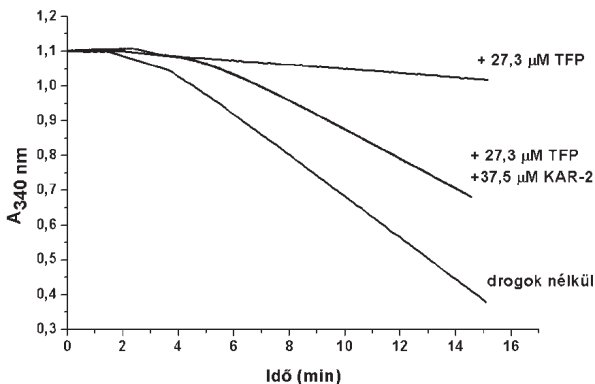


11. ábra. TFP (●), VBL (■) és KAR-2 (▲) hatása a CaM PDE-ra kifejtett aktiváló hatására. 100 %-nak a PDE CaM nélkül mért aktivitását tekintettem. A mért pontokra szigmoid görbét illesztettem az Origin 8.0 szoftver segítségével.

Az aktiválás mértékét a drogkoncentráció függvényében ábrázolva (11. ábra) látható hogy a vinblasztin hasonlóan viselkedik, mint a klasszikus kompetitív CaM antagonistá TFP: mindkét molekula felfüggeszti a CaM PDE aktiváló hatását. Az ábráról leolvasható hogy vinblasztin félhatásos koncentrációja kb. egy nagyságrenddel nagyobb, mint a TFP-nek. A mérési pontokból látható, hogy ellentétben a vinblasztinnal, a KAR-2 esetében a

CaM aktiváló hatása részben megmarad, 30 μM KAR-2 koncentrációnál kb 4-szeres aktiválás mérhető. Ez kb. 30% gátlást jelent a CaM PDE-re kifejtett aktiváló hatásában.

Mivel a CD spektroszkópiás vizsgálatoknál azt tapasztaltam, hogy a KAR-2 perturbálja a TFP kötődését CaM-hoz, az aktivitásmérést a két drog egyidejű jelenlétében is elvégeztem. A kísérlet során a TFP koncentrációja 27,3 μM , a KAR-2 –é 37,5 μM volt (12. ábra).

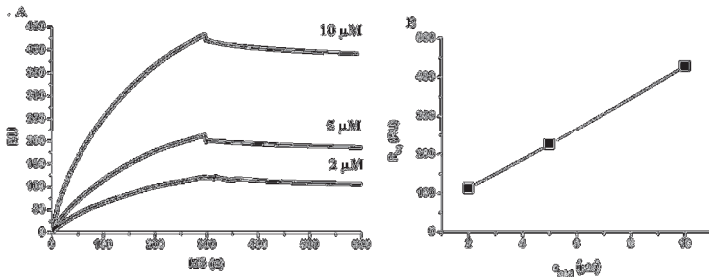


12. ábra. PDE aktivitás 27,3 μM TFP , 27,3 μM TFP + 37,5 μM KAR-2 mellett , illetve drogek nélkül . A CaM koncentráció mindhárom esetben 20 nM.

Mint ahogy várható, ekkora TFP koncentráció már teljesen gátolja a CaM PDE-ra gyakorolt aktiváló hatását, KAR-2 mellett azonban a mért aktivitás több mint ötször akkora volt, mintha csak a TFP lett volna jelen, tehát a KAR-2 jelenlétében a gátló hatás jelentősen mérséklődik. Ez a viselkedés az ún. „liberátor” molekulákra jellemző: a liberátorok olyan anyagok, amelyek önmagukban nincsenek hatással egy rendszerre, ugyanakkor, az aktiv molekulák hatását megváltoztatják (78). Mivel korábbi vizsgálatok alapján ismert (57), hogy mindhárom molekula hasonló affinitással kötődik a CaM-hoz (μM -os nagyságrendű K_D), az antagonista hatás hiánya miatt feltehető, hogy a KAR-2 molekula a TFP-től és vinblasztintól különböző kötőhellyel rendelkezik a fehérjén.

KAR-2 és TFP hatása a CaM - aldoláz kölcsönhatásra

Az SPR egy érzékeny módszer makromolekulás kölcsönhatások gyors és érzékeny vizsgálatára. Ennek segítségével vizsgáltam a KAR-2 illetve a TFP hatását a CaM aldolázhoz való kötődésére. Az aldoláz glikolitikus enzim, amelynek kötődését CaM-hoz és a kölcsönhatás enzimre kifejtett gátló hatását kutatócsoportunkban fedezték fel (17). Az aldoláz használatának egyik előnye, hogy affinitása a CaM-hoz összemérhető a CaM antagonistá drogokéval ($K_D \sim 10^{-6}$ M), és emiatt azokat nem kell túl nagy koncentrációban alkalmazni, ahol esetleg már nonspecifikus kölcsönhatások is fellépnének. A kísérlet során az Anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően immobilizáltam a CaM-t a sztreptavidin felszínre. Az aldolázt először különböző koncentrációkban injektáltam és a görbék alapján meghatároztam a kölcsönhatás kinetikai és egyensúlyi paramétereit (13. ábra). Két mérés között, a kötődött aldolázt 20 mM EGTA injektálásával sikerült eltávolítanom, tehát a felületre kötött CaM a célfehérjéhez Ca^{2+} -függő módon tud kötődni. Ez alapján megállapítható, hogy az immobilizálás ellenére működőképes maradt. Ezt a kérdést azért volt fontos tisztázni, mivel a CaM célfelismerésében nagy szerep hárul a fehérje flexibilitására, amit az immobilizálás esetleg megszüntethet.



13. ábra Aldoláz injektálások 10 (a), 5 (b) és 2 μM (c) koncentrációban (A), és az egyes görbékre meghatározott egyensúlyi telítettség (R_{eq}) értékek az aldoláz koncentráció függvényében (B).

Az aldoláz-CaM kölcsönhatás nemlineáris paraméterbecsléssel (BiaEvaluation 3.0) számolt kinetikai állandói:

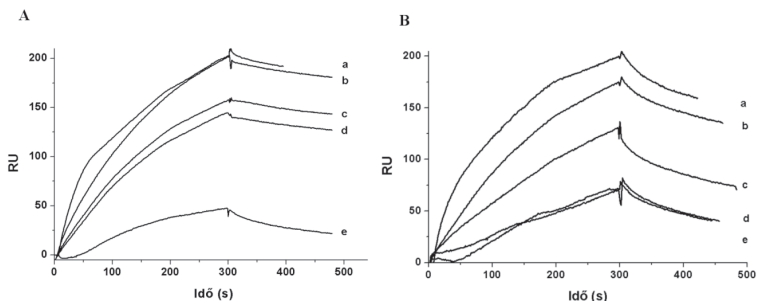
$$k_a = (617,0 \pm 2,7) \text{ 1/Ms}$$

$$k_d = (1,95 \cdot 10^{-4} \pm 1,9 \cdot 10^{-5}) \text{ 1/s}$$

$$K_d = k_d / k_a = 3,16 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

Ezek az értékek jól egyeznek a korábban fluoreszcencia spektroszkópiával meghatározott paraméterekkel (79).

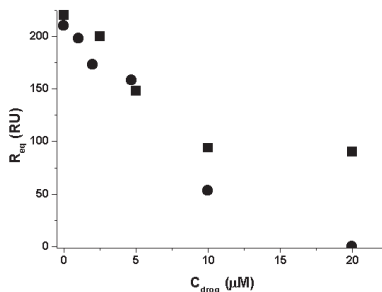
Az adott koncentrációhoz tartozó egyensúlyi telítettség (R_{eq}) az aldoláz koncentráció függvényében változik, ami azt jelenti, hogy ebben a koncentrációtartományban vizsgálható az egyes drogok gátló hatása. Ebből a célból 5 μM koncentrációjú aldolázt különböző koncentrációjú TFP-vel injektáltam a felszínre. A mért görbékből látható, hogy növekvő TFP koncentrációnál csökken a kötődött aldoláz mennyisége, 20 μM TFP pedig már teljesen felfüggeszti a kölcsönhatást (14A - 15. ábrák).



14. ábra (A) 5 μM aldoláz TFP nélkül (a) és 1 (b), 2 (c), 5 (d) illetve 10 μM TFP jelenlétében injektálva, 20 μM TFP esetén nincs kötődés (nincs ábrázolva); (B) 5 μM aldoláz KAR-2 nélkül (a) és 2,5 (b), 5 (c), 10 (d) illetve 20 μM KAR-2 jelenlétében injektálva.

KAR-2-vel 2,5 - 20 μM -os koncentrációtartományban mértem, a mért szenzogramokból és az egyensúlyi telítettség értékekből (14 - 15. ábrák) megállapítható, hogy 2,5 μM KAR-2-nek még kis hatása van a kötődésre, e felett gátolja a kölcsönhatást, de 10 és 20 μM KAR-2 hatása között már nincs jelentős különbség, tehát 10 μM -nál már

kifejti a maximális hatását, ami kb. 60% -os gátlásnak felel meg. Tehát a KAR-2 nem tudja teljesen leszorítani az aldolázt a CaM-ról.

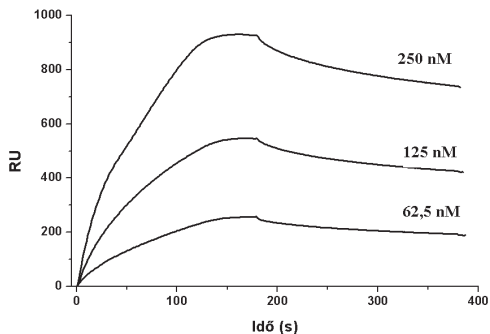


15. ábra Egyensúlyi telítettség (R_{eq}) értékek a KAR-2 (■) illetve TFP (●) koncentráció függvényében.

A mérések alapján megállapítható, hogy az aldoláz esetén a KAR-2 kisebb mértékben gátolja a fehérje bekötődését az immobilizált CaM-ra, mint a TFP. Míg a TFP teljes felfüggesztést képes elérni, addig a KAR-2 csak korlátozott mértékben gátolja a folyamatot.

TPPP/p25 : egy új CaM célfehérje

Kutatócsoportunkban sikerült a TPPP/p25 néhány kölcsönható partnerét azonosítani, és jellemezni a kölcsönhatások funkcionális illetve patológias hatásait (66,80). Az egyik új azonosított kölcsönható partner a CaM volt, amelyet mahaagy extraktból affinitáskromatográfiás módszerrel azonosítottak (81). A kölcsönhatás kvantitatív jellemzését SPR segítségével végeztem az aldolázzal már beállított körülmények között: a felszínre kötött CaM felett TPPP/p25-t áramoltattam különböző koncentrációkban (17. ábra).



17. ábra TPPP/p25 injektálása különböző koncentrációkban CaM-nal borított felszínre.

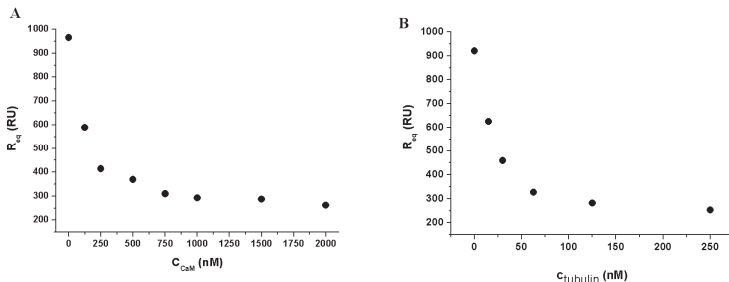
A felvett szenzorgramokból látható, hogy a TPPP/p25 kötődik a CaM felszínhez. A kölcsönhatás kinetikai és egyensúlyi paraméterei:

$$k_a = (1,41 \pm 0,06) * 10^4 \text{ l/Ms}$$

$$k_d = (1,92 \pm 0,12) * 10^{-3} \text{ 1/s}$$

$$K_D = k_d / k_a = 4,8 * 10^{-8} \text{ M}$$

A mérést Ca^{2+} -mentes pufferben (1 mM EGTA) végezve a kötődés azonos mértékű volt, tehát a CaM Ca^{2+} -független módon kötődik a TPPP/p25-höz. Mivel ez egy újonnan azonosított kölcsönhatás, annak megerősítésére, hogy specifikus kötődésről van szó, nem pedig a felszínhez rögzített fehérje által okozott artefactumról, olyan méréseket is végeztem ahol az áramló fázisban a TPPP/p25 mellett CaM illetve tubulin is volt (18. ábra)



18. ábra. TPPP/p25 kötődésének gátlása CaM-nal borított felszínhez:oldott CaM-nal (A) illetve tubulinnal (B)

Mint a görbékről látható mind a CaM, mind tubulin hatására csökkent a felszínre kötődött fehérje mennyisége. Az oldatban lévő CaM által kifejtett gátló hatás alapján megállapítható, hogy a kölcsönhatás oldatban is létrejön: a felszínhez kötött és az oldott CaM verseng a TPPP/p25-ért. Hasonló az oka a tubulin gátló hatásának is: az oldatban kialakuló tubulin – TPPP/p25 komplex nem kötődik a CaM felszínhez. A tubulin esetén látható erősebb gátlást feltehetően az okozza, hogy oldatban a tubulin erősebben kötődik TPPP/p25-höz mint a CaM. Ez utóbbi méréseket EGTA jelenlétében végeztem, mivel a Ca^{2+} -CaM tubulinnal is képes kölcsönhatni és ez zavarta volna az eredmények értelmezését. A TPPP/p25-el végzett méréseim során vizsgáltam azt is, hogy az általam a korábbi méréseknél használt drogok (KAR-2, TFP) gátolják-e a CaM-TPPP/p25 komplex kialakulását. Ellentétben a várakozásaimmal, sem a TFP, sem a KAR-2 nem gátolta a TPPP/p25 kötődését a CaM-nal borított felszínre.

A CaM – KAR-2 komplex röntgenkristallográfiás szerkezete

Az ELTE TTK Kémia Intézetének Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratóriumával együttműködésben elvégzett sikeres kristálynövesztést és a röntgenkristallográfiás adatgyűjtést követően dr. Harmat Veronika segítségével sikerült meghatároznom a CaM-

KAR-2 komplex háromdimenziós szerkezetét 2,12 Å felbontással.

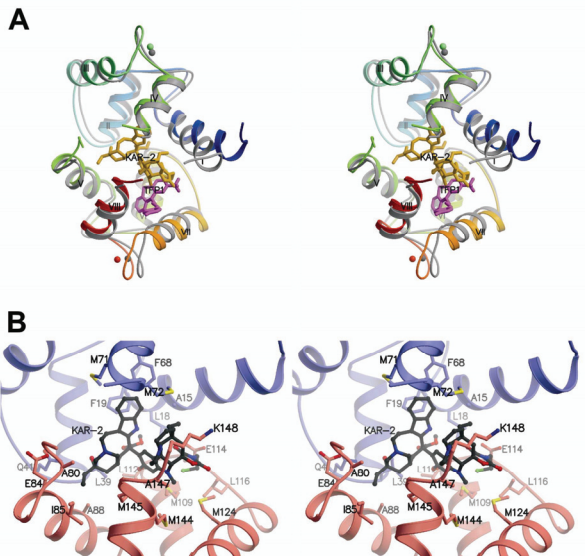
Kristály paraméterek

Térce csoport	P6 ₁ 22
Cellaállandók	a = b = 37,573 Å, c = 356,662 Å
Adatminőség	
d _{min}	2,12
R _{meas}	0,074
Teljesesség	98,7 %
Észlelt/önálló reflexiók száma (szimmetria)	127375/9429
I/σ (I)	23,39
Finomítás	
R	0,211
R _{szabad} ^b	0,261
Átlagos négyzetes eltérés az ideális geometriától	
Kötéshosszak (Å)	0,005
Kötésszögek	1,215
Oldallánckok elhelyezkedése a Ramachandran térképen:	
φ / ψ a legkedvezőbb régióban	120
φ / ψ a megengedett régióban	7
φ / ψ a tiltott régióban	0

1. Táblázat A kristály és a meghatározott fehérjeszerkezet paraméterei

A szerkezetfinomítást követően kapott modell jól illeszkedik az elektronsűrűségi térképbe, ez alól kivételek az Ala1, Asp2, Lys75, Met76 aminosavak teljes egészében valamint a Lys77, Asp78, Asp80, Lys94, Lys105, Arg106, Lys115, Glu119, Glu123, Arg126, Ile130 és a Glu139 aminosavak oldalláncai, amelyek a kristályban flexibilisek és emiatt az elektronsűrűségi térképben nem azonosítható a helyzetük.

A fehérje globális szerkezete kompakt, zárt konformációt mutat, amely hasonló a CaM-antagonista molekulák (TFP, aril-alkil-amin (34)) valamint a CaM célpeptidek által létrehozott konformációhoz (19. ábra). A KAR-2 molekula helyzetét és szerkezetét ugyancsak jól meghatározza az elektronsűrűségi térkép. A molekula a C- és N- terminális domén között, azaz interdomén pozícióban található.

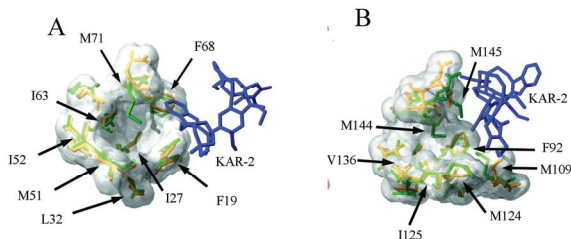


19. ábra (A) a CaM-KAR-2 komplex 3 dimenziós szerkezetének sztereóábrája (N-terminális:kék, C-terminális piros, KAR-2:sárga) összehasonlítva az 1 TFP-t tartalmazó CaM (1CTR) (szürke, TFP: lila) szerkezetével, a CaM hélicei római számokkal vannak jelölve (I-VIII-ig); (B) a KAR-2 kötő régió közelebről, a KAR-2-vel kölcsönható aminosavak feliratozva. Az ábrák a MolScript és Raster3D programok segítségével készültek.

A KAR-2 molekula katarantin régiója főként hidrofób kölcsönhatásokat alakít ki a CaM N-terminális doménjében található aminosav oldalláncokkal (Phe19, Leu39, Phe68, Met71, Met72), az itt lévő indol gyűrű egy sekély mélyedésben található a fehérjén. A drog vindolin része a fehérje C-terminális doménjével hat kölcsön, de ellentétben a katarantin régióval, a molekula ezen oldala poláris kölcsönhatásokat is kialakít (Glu184, Glu114, Lys148) az apoláros interakciók mellett (Ile85, Met109, Met124, Met144, Met145). Fontos külön is kiemelni, hogy ebben a régióban található az oxazolidino gyűrű, amely leginkább megkülönbözteti a KAR-2-t a vinblasztintól, az ezen található Cl atom a Met109 S δ atomjával valamint a Glu114 karboxilát csoportjával kerül kapcsolatba.

Összehasonlítva a CaM-KAR-2 szerkezetét a CaM – TFP (pdb kód 1CTR)

komplexével látható, hogy a TFP által okozott globális konformációváltozás (a fehérje „összecsuklása”) a KAR-2 hatására is bekövetkezik. Ugyanakkor egymásra fektetve a két szerkezetet szembevetünk, hogy a KAR-2 és az első TFP molekula kötőhelye különböző (19/A ábra), mivel ez utóbbi a C-terminális domén hidrofób zsebébe kötődik. Ez összhangban van a CD spektroszkópiával kapott eredményekkel, miszerint a KAR-2 leszorítja a második, interdomén helyre kötődő TFP molekulát.

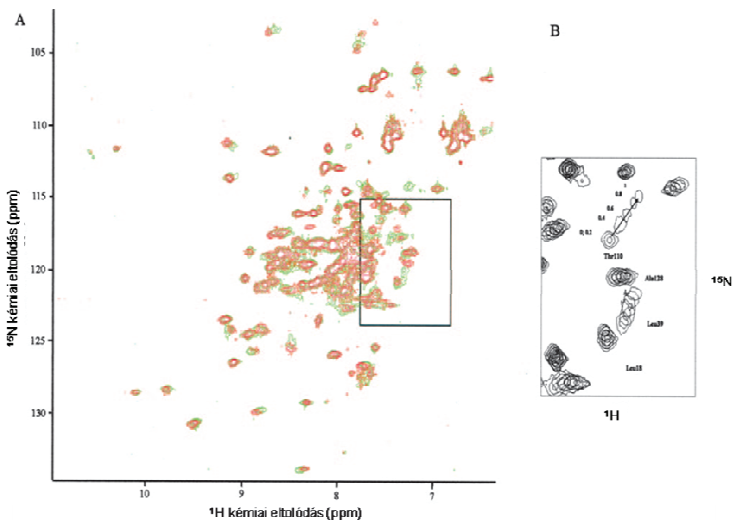


20. ábra A hidrofób zsebek bezáródása az N- (C) illetve C-terminális (D) doménban. A szürke molekuláris felszín a Ca^{2+} -CaM-ra (1CLL) (sárga) lett kiszámolva, amely a CaM-KAR2 szerkezetre (zöld) lett illesztve. Látható hogy a zöld színű M71 és M144 kinyúlik a másik szerkezetre számolt molekuláris felszínből és bezárja a hidrofób zsebet. Az ábrák a SwissPDBview 3.7 és POVray 3.5 programokkal készültek.

A CaM-KAR-2 szerkezetnek egy másik érdekes tulajdonsága, hogy a kötőrégió felismerésében fontosnak tartott hidrofób zsebek hiányoznak mindkét doménból. Ennek oka hogy a III-as és IV-es illetve VI-os és VII-es hélixek közötti interhelikális szögek kisebbek a CaM-KAR-2 esetében, mint a CaM vagy más CaM-antagonista szerkezetekben, ennek következményeként (20/A-B ábra) a Met71 illetve Met144 oldalláncok a hidrofób zsebbe nyomulnak, bezárva azt. Ezek alapján feltehető, hogy a CD spektroszkópiás kísérleteknél vizsgált CaM-TFP-KAR-2 komplexben a C-terminálisba kötődött TFP más mechanizmussal kötődik a CaM-hoz mint KAR-2 nélkül.

NMR spektroszkópia

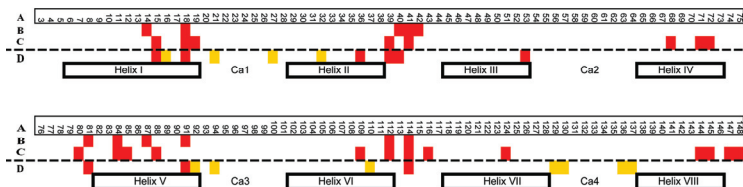
Mint az Irodalmi áttekintésben kitértem rá, korábbi vizsgálatokban jelentős különbségek mutatkoztak az NMR-el illetve a röntgenkristallográfiával nyert CaM szerkezetek között. Abból a célból, hogy a kötőhely helyzetére vonatkozóan oldatfázisban is információhoz jussunk, a fehérjekristályosítással párhuzamosan NMR-el is vizsgáltuk a CaM-KAR-2 komplex szerkezetét. Ennek során ^{15}N -el jelzett CaM-t titrálunk KAR-2-vel az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. Az egyes titrálási lépések után felvett 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrumokat egymásra fektetve látható, hogy bizonyos csúcsok pozíciója megváltozik (21. ábra), egyes csúcsok eltűnnek illetve újak jelennek meg.



21. ábra ^{15}N CaM NMR (HSQC) spektruma önmagában (piros) illetve 1,5 mM KAR-2 (zöld) jelenlétében. A kinagyított régióban látható egyes asszignált csúcsok KAR-2 hatására történő elmozdulása

Egy fehérje HSQC spektrumában minden csúcshoz a fehérje egy adott aminosava rendelhető, a spektrum asszignációjával meghatározható, hogy a megváltozott csúcsok

melyik aminosavhoz tartoznak, tehát ezzel a módszerrel kideríthető, hogy a KAR-2 kötődése mely aminosavak kémiai környezetét változtatja meg. Az asszignált csúcsok közül 20 pozíciója változott meg jelentősen, ezek közül 10-10 található az N- illetve a C-terminális doménben, ez összhangban van a kristályszerkezettel, ahol a KAR-2 interdomén helyzetben található. A röntgenszerkezetben látható globális konformációváltozás miatt azonban azt is szem előtt kell tartani, hogy a kémiai környezet megváltozása nemcsak a KAR-2-vel való kölcsönhatás miatt történhet, hanem azért is, mert új kapcsolatok alakulnak a fehérjén belül, a két globuláris domén között. Emiatt szükséges a röntgenkristallográfiával és az NMR spektroszkópiával kapott eredmények mélyebb összevetése. A röntgenszerkezetből megállapítható, hogy milyen új kötőfelszínek alakulnak ki a két domén között, ezáltal meg lehet különböztetni, hogy azok az aminosavak, amelyeknek a jele KAR-2 hatására változik, a droggal hatnak-e kölcsön, vagy pedig a fehérje másik doménjével (22. ábra). A kötődés eredményeként kapcsolat alakul ki az N-terminális I-es hélice, valamint a C-terminálisban található VI-os és VII-es hélixet összekötő hurok között.



22. ábra Az NMR spektroszkópiás és röntgendiffrakcióval kapott eredmények összevetése: (A) pozíció a CaM szekvenciájában, (B) CaM-CaM illetve (C) CaM – KAR-2 kontaktfelszínek a kristályszerkezetben, (D) kémiai eltolódás változások az NMR spektrumban KAR-2 hatására.

Ugyancsak KAR-2 hatására alakul ki kölcsönhatás a II-es és III-as hélix közti hurok valamint az V-ös hélix között. Ezen új kötőfelszínek ismeretében már eldönthető, hogy a titrálás hatására megváltozott helyzetű csúcsok a KAR-2-vel való közvetlen kölcsönhatás vagy pedig az új, kötődés által indukált interdomén kapcsolat kialakulásának következményei. Három asszignált csúcs esetében (Ala15, Phe16, Leu39) egyértelműen megállapítható, hogy közvetlen kölcsönhatás eredménye. A Leu18 estén tapasztalt

jelváltozás mindkét hatásnak betudható, mivel mind a KAR-2-vel, mind pedig a VI-os és VII-es hélixet összekötő hurokkal kölcsönhat. A Ser81, Val91, Phe92 és Lys94 aminosavakhoz tartozó csúcsok elmozdulása interdomén kölcsönhatás eredménye: ezen aminosavak az V-ös hélixben találhatók és a II-es és III-as hélix közti hurokkal érintkeznek. A VI-os és VII-es hélix között található Glu114 egyrészt a már említett I-es hélixszel alakít ki kapcsolatot (Leu18) illetve a KAR-2-vel is kölcsönhat.

A két szerkezetvizsgálati módszerrel kapott eredményeket összevetve tehát sikerült megállapítanom, hogy a röntgenkristallográfiával kapott zárt konformáció nem csupán a kristályszerkezetre jellemző tulajdonság, hanem a fehérje oldott állapotban is ilyen konformációval rendelkezik.

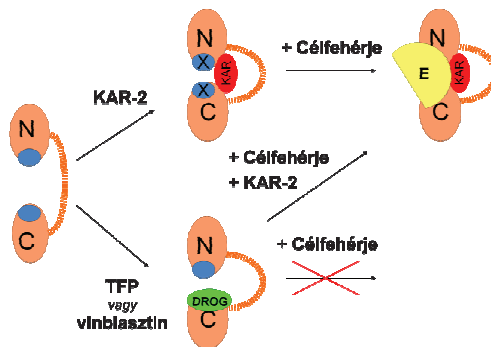
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A KAR-2-vel végzett munkám központi célkitűzése az volt, hogy választ találjak a KAR-2 és a vinblasztin eltérő viselkedésére *in vivo* és *in vitro* rendszerekben. Mint már kitértem rá, a korábbi *in vivo* vizsgálatok során a KAR-2 kevésbé volt toxikus mint a vinblasztin. Mivel mindkét drog ugyanazon a kötőhelyen, illetve hasonló affinitással kötődik tubulinhoz, lehetséges, hogy a két molekula eltérő mértékű toxikusságának okait, legalábbis részben, egy másik fehérjével való kölcsönhatásban kell keresni. Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy az egyik ilyen potenciális célmolekula a CaM lehet (52). Munkám során a CaM két célfehérjéje, az aldoláz és a PDE esetén is igazoltam, hogy a vinblasztin CaM antagonistaként működik. Ezzel szemben a KAR-2 a vizsgált rendszerekben nem viselkedett antagonistaként: sem az aldolázhoz való kötődést, sem a CaM PDE aktiválását nem tudta teljes mértékben gátolni. Ezen eredmények ismeretében feltételezhető, hogy a vinblasztin *in vivo* is kötődik CaM-hoz és a kemoterápiás kezelések során tapasztalt toxikus mellékhatások egy része ebből a kölcsönhatásból eredethezethető.

Funkcionális vizsgálataim során az is kiderült, hogy a KAR-2 molekula liberátorként viselkedik: a kompetitív antagonistá TFP gátló hatását megszünteti a CaM - PDE rendszerben. A CaM-hoz kötődő első TFP molekula a Ca^{2+} kötés által létrehozott, CaM-kötő régiók felismerésében elsődleges C-terminális hidrofób doménbe kötődik, akárcsak a legtöbb célfehérje. Ezáltal a funkcionális tesztben a PDE és a TFP verseng a kötőhelyért, és ez eredményezi a szigmoid inhibíciós görbét. KAR-2 jelenlétében azonban a TFP hatása csökken, tehát a két drog kötőhelye átfed egymással, de a KAR-2 mégsem viselkedik antagonistaként. A liberátor hatás alapján valószínűsíthető egy CaM-enzim-KAR-2 terner komplex létrejötte, amelyben az enzim megőrzi aktivitását.

A krisztallográfiás és NMR vizsgálatok eredményei magyarázatot adnak a két vinca alkaloid különböző viselkedésére a kötődési és funkcionális vizsgálatokban. A KAR-2 molekula bekötődése hasonló globális szerkezetváltozást indukál, mint a célpeptidek illetve a CaM antagonisták: az oldatfázisban zárt és nyitott konformáció között fluktuáló CaM molekula KAR-2 hatására a zárt konformációban stabilizálódik. A KAR-2

a fehérjén belül nem az antagonisták és célfehérjék felismerésében kulcsfontosságúnak tartott hidrofób zsebek valamelyikébe kötődik, hanem egy új, interdomén kötőhelyet alakít ki. Mind a CD spektroszkópiás, mind a szerkezet-összehasonlító vizsgálatok alapján egyértelmű, hogy a kötőhely átfed a CaM-nal kölcsönható második TFP-vel, ugyanakkor az első TFP a fehérjéhez kötve marad KAR-2 jelenlétében is.



23. ábra A KAR-2-CaM-Enzim terner komplex létrejötte. A KAR-2 a vinblasztinnal ellentétben nem gátolja CaM-célfehérje (E) kölcsönhatás létrejöttét, az antagonista TFP jelenlétében liberátorként viselkedik. KAR-2 jelenlétében egy terner komplex jön létre amelyben a CaM képes ellátni feladatát, regulálni a célfehérje működését.

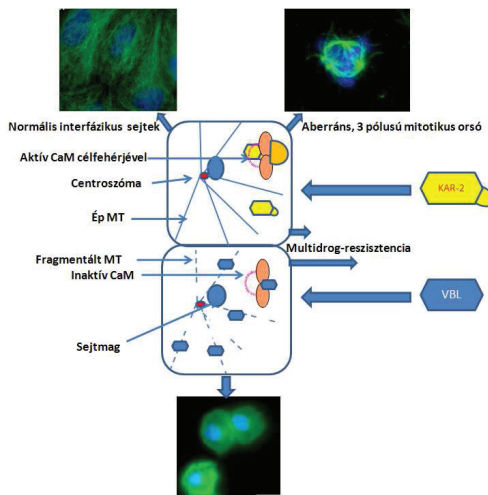
Az alapján hogy a KAR-2-CaM-TFP terner komplex létrejön, feltételezhető, hogy a TFP helyett a célfehérje is képes a CaM-hoz kötődni KAR-2 jelenlétében. Ennek CaM-célfehérje-KAR-2 terner komplexek létrejöttét valószínűsíti a KAR-2 részleges gátló hatása illetve liberátor tulajdonsága. Ebben a terner komplexben a KAR-2-t kötött CaM képes a célfehérjéhez kötődni és a szabályozási feladatát ellátni (23. ábra). Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy a CaM-célfehérje kölcsönhatásnak másképpen kell létrejönnie mint KAR-2 nélkül, erre utal egyrészt a részleges gátlás (vagyis a feltételezhetően csökkent affinitás), másrészt a CaM-KAR-2 röntgenkristallográfiás szerkezete is. A KAR-2 feltehetőleg kölcsönhat néhány aminosavdaláncal amelyek a célfehérjéhez kötődnek, ám ezen kölcsönhatások hiánya csak a kötődés kismértékű gyengítéséhez elég, a megszüntetéséhez nem.

Mint az eredmények tárgyalásánál kitértem rá, KAR-2 hatására a CaM szerkezetéből eltűnnek a korábban célfelismerésben kulcsfontosságúnak tartott hidrofób zsebek. Korábbi közleményekben csak egy olyan szerkezetet találtam, ahol hasonlólt tapasztaltak, ebben a szerkezetben a CaM egy mirisztoilált alaninban gazdag protein kináz C peptid szubsztráttal (MARCKS) van komplexben, ebben az esetben csak az N-terminális doménben záródik be a hidrofób zseb (82).

Feltételezhető, hogy a vinblasztinnal ellentétben, a KAR-2-vel komplexált CaM képes célfehérjéihez kötődni és ebben a terner komplexben ellátni regulációs feladatait (22. ábra). Ez a kölcsönhatás azonban más mechanizmussal kell, hogy kialakuljon mint a KAR-2 távollétében, egyrészt a drog térigénye másrészt a hidrofób zsebek hiánya miatt. Az alternatív kötődés létrejöttét segíti a CaM flexibilitása: a két globuláris domént összekötő régió számos célfehérjéhez képes adaptálni a C- és N-terminális domének relatív pozícióját. A KAR-2 molekula ugyancsak rendelkezik egy flexibilis gyűrűvel, amely szintén képes lehet egy, a terner komplexhez energetikailag megfelelőbb konformáció felvételére a CaM-hoz kötött állapotában.

Az, hogy a CaM-KAR-2 komplexben a fehérje megőrzi aktivitását, magyarázatot adhat a mellékhatások hiányára *in vivo* vizsgálatokban. Ugyanakkor, feltételezhető, hogy a KAR-2 közvetve is hat a mikrotubuláris hálózat regulációjára. A CaM képes szabályozni MT stabilizáló fehérjéket (mielin bázikus fehérje, STOP, tau) (83). Elképzelhető hogy a KAR-2 ezen kölcsönhatásokat szelektíven képes gátolni, és így fejt ki hatását a mikrotubuláris hálózatra. Egy ilyen potenciális kölcsönhatás a CaM–TPPP/p25 lehetne. Az általam SPR segítségével meghatározott kötési erősség alapján valószínűsíthető, hogy a két fehérje közti kölcsönhatás *in vivo* is létrejön. Egy, az interneten elérhető CaM-kötő régió jósló programmal (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/sequence.html>) a TPPP/p25 szekvenciája alapján megjósolható, hogy a CaM a fehérje melyik részéhez kötődik (26). A program szerint a szarvasmarha TPPP/p25 97-116 közötti régiója CaM kötőhelyet tartalmaz. Ugyanez a program a TPPP/p20 fehérjén is talált CaM kötőhelyet a TPPP/p25-el homológ régióban (51-70 aminosavak). Ez azért lényeges mert ez a szekvencia a TPPP/p20 NMR-el meghatározott szerkezetében α -helikális szerkezetű, és mint az Irodalmi áttekintésben kitértem rá a CaM a célfehérjéin általában bázikus α -héliceket ismer fel.

Munkám eredményeként sikerült megmagyaráznom a KAR-2 különleges viselkedését CaM – célfehérje rendszerekben. Igazoltam, hogy KAR-2 egy új típusú kötőhelyet alakít ki magának a CaM-on, amely így képes ellátni szabályozó feladatát. A fentiek, és a természetes vinca-alkaloidok CaM antagonistájaként tulajdonságának ismeretében feltehető, hogy részben ez lehet az oka a KAR-2 enyhébb toxicitásának *in vivo* tesztekben.



24. ábra. A KAR-2 hatásmechanizmusának sémája. A fotókon vinblasztinnal és KAR-2-vel kezelt Caco-2 sejtek láthatóak amelyeknek a mikrotubuláris hálózata (zöld) immunfestéssel tették láthatóvá; a sejtmag kék színű (55). A KAR-2 szelektíven az osztódó sejteket támadja, multipoláris mitotikus orsó kialakulását okozva, az interfázisú sejtek mikrotubuláris hálózata érintetlenül hagyja. Ezzel ellentétben a vinblasztin, függetlenül a sejt állapotától depolimerizálja a mikrotubuláris hálózatot, diffúz tubulinoszlat eredményezve.

Kutatócsoportunk több éves munkájának eredményeként sikerült tisztáznunk a KAR-2-nek, ennek az egyedülálló hatású sejtosztódásgátló vegyületnek a farmakológiáját. A 24. ábra tartalmazza ezen eredmények sematikus összefoglalását. A KAR-2 enyhébb mellékhatásait két tényező magyarázza: egyrészt a CaM antagonizmus hiánya, másrészt pedig a KAR-2 azon egyedi tulajdonsága, hogy szelektíven a mitotikus orsót célozza, az interfázisú MT hálózatot pedig nem károsítja. Ez utóbbi hatást már három különböző sejtvonalon sikerült igazolni (SH5SY, HeLa, Caco-2) (53-55). A molekula hatékonyságát

ugyancsak segíti, hogy a KAR-2, ellentétben a vinblasztinnal, nem szubsztrátja a rákos sejtek multidrog rezisztenciájáért felelős P-gp aktív transzporternek, tehát könnyebben képes a sejtekbe bejutni és ott hatását kifejteni (55).

Annak eldöntésére további vizsgálatok szükségesek., hogy pontosan mi az a folyamat, amelyet a KAR-2-vel ellentétben a természetes vinca alkaloidok gátolnak, és amely ezen molekulák toxicitását okozza. Az eddigi eredményeink alapján azonban kijelenthető hogy a KAR-2 egy nagyon ígéretes tumorelles molekula amely további vizsgálatot és fejlesztést érdemel.

HIVATKOZÁSJEGYZÉK

1. Strynadka, N. C. J., és James, M. N. G. (1990) *Proteins* **7**, 234-248
2. Gifford, J. L., Walsh, M. P., és Vogel, H. J. (2007) *Biochem. J.* **405**, 199-221
3. Crivici, A., és Ikura, M. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Struct.* **24**, 85-116.
4. Linse, S., Helmersson, A., és Forsén, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 8050-8054
5. Babu, Y. S., Bugg, C. E., és Cook, W. J. (1988) *J. Mol. Biol.* **204**, 191-204
6. Schumacher, M. A., Crum, M., és Miller, M. C. (2004) *Structure (London, England: 1993)* **12**, 849-860
7. Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., és Bax, A. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 768-776.
8. Ishida, H., Nakashima, K., Kumaki, Y., Nakata, M., Hikichi, K., és Yazawa, M. (2002) *Biochemistry* **41**, 15536-15542
9. Barbato, G., Ikura, M., Kay, L. E., Pastor, R. W., és Bax, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 5269-5278
10. Wilson, M. A., és Brunger, A. T. (2000) *J. Mol. Biol.* **301**, 1237-1256
11. O'Neil, K. T., és DeGrado, W. F. (1990) *TIBS* **15**, 59-64
12. Finn, B. E., és Forsén, S. (1995) *Structure (London, England: 1993)* **3**, 7-11
13. Walsh, M. P. (1994) *Mol. Cell. Biochem.* **135**, 21-41
14. O'Tousa, J. E. (2002) *Adv. Exp. Med. Biol.* **514**, 493-505
15. Kahl, C. R., és Means, A. R. (2003) *Endocr. Rev.* **24**, 719-736
16. Hudmon, A., és Schulman, H. (2002) *Biochem. J.* **364**, 593-611
17. Orosz, F., Christova, T. Y., és Ovádi, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **957**, 293-300.
18. Cooper, D. M. F. (2003) *Biochem. J.* **375**, 517-529
19. Goraya, T. A., és Cooper, D. M. F. (2005) *Cell. Signal.* **17**, 789-797
20. Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Nakane, M., Förstermann, U., és Murad, F. (1992) *Cell Calcium* **13**, 427-434
21. Erneux, C., Passareiro, H., és Nunez, J. (1984) *FEBS Lettr.* **172**, 315-320
22. Padilla, R., Maccioni, R. B., és Avila, J. (1990) *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 35-41
23. Sasaki, Y., és Hidaka, H. (1982) *Biochim. Biophys. Res. Com.* **104**, 451-456.
24. Erickson-Viitanen, S., és DeGrado, W. F. (1987) *Methods Enzymol* **139**, 455-478
25. Rhoads, A. R., és Friedberg, F. (1997) *FASEB J.* **11**, 331-340
26. Yap, K., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., és Ikura, M. (2000) *J. Struct. Funct. Genomics* **1**, 8-14

27. Vetter, S. W., és Leclerc, E. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 404-414
28. Elshorst, B., Hennig, M., Försterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H., Vorherr, T., és Carafoli, E. (1999) *Biochemistry* **38**, 12320-12332.
29. Drum, C. L., Yan, S.-Z., Bard, J., Shen, Y.-Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., és Tang, W.-J. (2002) *Nature* **415**, 396-402
30. Weiss, B., Prozialeck, W. C., és Wallace, T. L. (1982) *Biochem. Pharmac.* **31**, 2217-2226
31. Vandonselaar, M., Hickie, R. A., Quail, J. W., és Delbaere, L. T. J. (1994) *Nature Struct. Biol.* **1**, 795-801.
32. Cook, W. J., Walter, L. J., és Walter, M. R. (1994) *Biochemistry* **33**, 15259-15265
33. Vértessy, B. G., Harmat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Orosz, F., és Ovádi, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 15300-15310.
34. Harmat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Bata, I., Csutor, A. S., Hermecz, I., Arányi, P., Szabó, B., Liliom, K., Vértessy, B. G., és Ovádi, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **297**, 747-755
35. Orosz, F., Telegdi, M., Liliom, K., Solti, M., Korbonits, D., és Ovádi, J. (1990) *Molec. Pharmacol.* **38**, 910-916
36. Nogales, E. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 277-302
37. Desai, A., és Mitchison, T. J. (1997) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83-117
38. Doxsey, S., McCollum, D., és Theurkauf, W. (2005) *Annual Review of Cell és Developmental Biology* **21**, 411-434
39. Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., és Mitchison, T. (1995) *Nature* **378**, 578-583
40. Dehmelt, L., és Halpain, S. (2005) *Genome Biol.* **6**, 204
41. Hirokawa, N., Noda, Y., és Okada, Y. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 60-73
42. Hlavanda, E., Kovacs, J., Olah, J., Orosz, F., Medzihradszky, K. F., és Ovadi, J. (2002) *Biochemistry* **41**, 8657-8664
43. Kumagai, H., Nishida, E., és Sakai, H. (1982) *J. Biochem.* **91**, 1329-1336
44. Lehotzky, A., Telegdi, M., Liliom, K., és Ovadi, J. (1993) *J Biol Chem* **268**, 10888-10894
45. De Bruyn, A., De Taeye, L., Simonds, R., Verzele, M., és De Pauw, C. (1982) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **91**, 75-85.
46. Yokoshima, S., Ueda, T., Kobayashi, S., Sato, A., Kuboyama, T., Tokuyama, H., és Fukuyama, T. (2003) *Pure Appl. Chem.* **75**, 29-38
47. Jordan, M. A., Thrower, D., és Wilson, L. (1991) *Cancer Res.* **51**, 2212-2222
48. Erickson, H. P. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **253**, 51-52
49. Derry, W. B., Wilson, L., és Jordan, M. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 2203-2211.
50. Duflos, A., Kruczyński, A., és Barret, J.-M. (2002) *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2**, 55-70

51. Orosz, F., Kovács, J., Lőw, P., Vértessy, B. G., Urbányi, Z., Ács, T., Keve, T., és Ovádi, J. (1997) *British. J. Pharmacol.* **21**, 947-954.
52. Orosz, F., Comin, B., Rais, B., Puigjaner, J., Cascante, M., Kovács, J., Tárkányi, G., Ács, T., Keve, T., és Ovádi, J. (1999) *Br. J. Cancer* **79**, 1356-1365
53. Comin-Anduix, B., Agell, N., Bachs, O., Ovadi, J., és Cascante, M. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 1235-1242.
54. Lehotzky, A., Tőkési, N., Gonzalez-Alvarez, I., Merino, V., Bermejo, M., Orosz, F., Lau, P., Kovacs, G. G., és Ovádi, J. (2008) *Philos. Transact. A, Math., Phys., Eng. Sci.* **366**, 3599-3617
55. Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Oltra-Noguera, D., Merino, V., Tőkési, N., Ovádi, J., és Bermejo, M. (2009) *Eur. J. Pharm. Sci.* **36**, 11-19
56. Molnár, A., Liliom, K., Orosz, F., Vértessy, B. G., és Ovádi, J. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* **291**, 73-82
57. Orosz, F., Vértessy, B. G., Salerno, C., Crifo, C., Capuozzo, E., és Ovádi, J. (1997) *British J. Pharmacol.* **21**, 955-962.
58. Takahashi, M., Tomizawa, K., Ishiguro, K., Sato, K., Omori, A., Sato, S., Shiratsuchi, A., Uchida, T., és Imahori, K. (1991) *FEBS Lettr.* **289**, 37-43
59. Takahashi, M., Tomizawa, K., Fujita, S. C., Sato, K., Uchida, T., és Imahori, K. (1993) *J. Neurochem.* **60**, 228-235.
60. Kovacs, G. G., Laszlo, L., Kovacs, J., Jensen, P.H., Lindersson, E., Botond, G., Molnar, T., Perczel, A., Hudecz, F., Mezo, G., Erdei, A., Tirian, L., Lehotzky, A., Gelpi, E., Budka, H., Ovadi J. (2004) *Neurobiol Dis.* **17**, 155-162
61. Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J. és Dunker, A. K. (2001) *Proteins: Structure, Function, és Genetics* **42**, 38-48
62. Altschul, S. F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402
63. Tirian, L., Hlavanda, E., Olah, J., Horvath, I., Orosz, F., Szabo, B., Kovacs, J., Szabad, J., és Ovadi, J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13976-13981
64. Lehotzky, A., Tirián, L., Tőkési, N., Lénárt, P., Szabó, B., Kovács, J., és Ovádi, J. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 6249-6259
65. Vincze, O., Tőkési, N., Oláh, J., Hlavanda, E., Zotter, A., Horváth, I., Lehotzky, A., Tirián, L., Medzihradszky, K. F., Kovács, J., Orosz, F., és Ovádi, J. (2006) *Biochemistry* **45**, 13818-13826
66. Oláh, J., Tőkési, N., Vincze, O., Horváth, I., Lehotzky, A., Erdei, A., Szájli, E., Medzihradszky, K. F., Orosz, F., Kovács, G. G., és Ovádi, J. (2006) *FEBS Lettr.* **580**, 5807-5814
67. Preusser, M., Lehotzky, A., Budka, H., Ovádi, J., és Kovács, G. G. (2007) *Acta Neuropathol.* **113**, 213-215
68. Gopalakrishna, R., és Anderson, W. B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830-836
69. Kincaid, R. L., Billingsley, M.L., Vaughan, M., (1988) *Methods Enzymol.* **159**,

605-626

70. Chock, S., Huang, C.Y. (1984) *Anal. Biochem.* **138**, 34-43
71. Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr* **26**, 795-800
72. 4, C. C. P. N. (1994) *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
73. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr.* **D53**, 240-255
74. Jones, T. A., Zou, J. -Y. Cowan, S. W. ,Kjeldgaard, M. . I. (1991) *Acta Crystallogr* **A47**, 110-119.
75. Lamzin, V. S., Wilson, K. S., (1997) *Methods Enzymol* **277**, 269-305.
76. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. és Thornton, J. M. ., (1993) *J. Appl. Crystallogr* **26**, 283-291
77. Vértessy, G. B., Harmath, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Orosz, F., és Ovádi, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 15300-15310
78. Keleti, T. (1967) *J. Theor. Biol.* **16**, 337-355.
79. Orosz, F., Christova, T. Y., és Ovádi, J. (1988) *Mol. Pharmacol.* **33**, 678-682
80. Orosz F., Lehotzky A., Oláh J., és Ovádi, J. (2009) TPPP/p25: A New Unstructured Protein Hallmarking Synucleinopathies. in *Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases* (Ovádi J. , Orosz F. szerk.), Springer.
81. Vincze, O., Hlavanda, E., Zotter, A., Horvath, I., Orosz, F., Vass, E., Perczel, A., és Ovadi, J. (2005) Structure és heteroassociations of the TPPP/p25, a new brain-specific protein. in *IUBMB 50th Anniversary Symposium*, Blackwell Publishing, Budapest, Magyarország
82. Yamauchi, E., Nakatsu, T., Matsubara, M., Kato, H., Taniguchi, H. (2003) *Nat Struct Biol* **10**, 226-231
83. Pirollet, F., Margolis, R. L., és Job, D. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1160**, 113-119

ÖSSZEFOGLALÓ

A 3'-(β -klóretil)-2',4'-dioxo-3,5'-spiro-oxazolidino-4-deacetoxi-vinblasztin (KAR-2) egy hatékony anti-mikrotubuláris ágens, amely tumorsejtekben szelektíven gátolja a mitózist. Doktori munkám során több módszerrel is igazoltam, hogy a KAR-2 tubulin/mikrotubulus mellett a Ca^{2+} -szenzor fehérje kalmodulinhoz is kötődik. A kalmodulin Ca^{2+} -kötött állapotában számos fehérjéhez kötődik és ezáltal regulálja azok működését. Foszfodiészteráz aktivitási és felületi plazmon rezoncia segítségével végzett kötődési vizsgálatok során kimutattam, hogy a KAR-2-vel komplexált kalmodulin aktív marad, képes ellátni szabályozó funkcióját. Ezzel ellentétben a KAR-2 anyamolekulája, a vinblasztin, CaM antagonistaként viselkedett a funkcionális vizsgálatok során. Mindemellett, a KAR-2 liberátorként viselkedve meggátolja, hogy a kalmodulin-antagonista trifluoperazin gátló hatását kifejtsen. Munkám során karakterizáltam a kalmodulin kölcsönhatását egy új célfehérjével, a kutatócsoportunkban izolált és azonosított Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25-el, vizsgálataimból kiderült hogy ezen kölcsönhatás kialakulását sem gátolja a KAR-2. Hogy ezen hatások okait kiderítsem, szerkezeti vizsgálatokat végeztem mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) illetve röntgenkristallográfia segítségével. A multidimenzionális NMR vizsgálatok során kiderült, hogy a KAR-2 bekötődése globális konformációváltozást indukál a fehérjén, a drog bekötődése a fehérje mindkét globuláris doménjában okozott kémiai eltolódásváltozást. A 2,12 Å felbontású kristályszerkezet alátámasztotta ezt az eredményt; a KAR-2-vel való kölcsönhatás eredményeként a fehérje zárt konformációt vesz fel, amelyben a KAR-2 interdomén pozícióban található. A KAR-2 hatására kialakult szerkezet hasonlít az antagonista TFP és kalmodulin által képzett globális szerkezetére ám a KAR-2 kötőhelye nem a C-terminális domén hidrofób zsebe amely antagonisták és célfehérjék elsődleges célpontja. A szerkezetvizsgálati módszerek eredményei alapján megállapítottam, hogy a drog új kötőhelyének köszönhető hogy a KAR-2 nem rendelkezik anti-kalmodulin hatással. A CaM antagonizmus hiánya magyarázhatja a korábbi *in vivo* vizsgálatokban tapasztalt, vinblasztinhoz képest enyhébb toxicitást.

ABSTRACT

3'-(β -chloroethyl)-2',4'-dioxo-3,5'-spiro-oxazolidino-4-deacetoxy-vinblastine (KAR-2) is a potent anti-microtubular agent that arrests mitosis in cancer cells without significant toxic side effects. In my Ph.D. thesis I demonstrate that in addition to targeting microtubules, KAR-2 also binds calmodulin a Ca^{2+} sensor protein responsible for the regulation of various enzymes. Binding and functional studies using surface plasmon resonance and phosphodiesterase assay, respectively, revealed that the calmodulin-KAR-2 complex maintained its ability to associate with a target enzyme and activate it. This effect is contradictory to that observed with its mother molecule vinblastine. KAR-2, however, counters the antagonistic effects of a classic anti-calmodulin agent, trifluoperazine. In addition, I identified a novel interacting partner protein of calmodulin, that is a recently discovered unstructured protein, the Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25, which heterologous interactions was found not to be affected by KAR-2 as well. To elucidate the unique feature of KAR-2 displaying in calmodulin-modulated systems, the three-dimensional structure of its complex was determined at atomic level both in solution using NMR and when crystallized using x-ray diffraction. Heterocorrelation ($(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ heteronuclear single quantum coherence) spectra of ^{15}N -labeled calmodulin indicated a global conformation change (closure) of the protein upon its binding to KAR-2. The crystal structure at 2.12 Å resolution revealed a more elaborated picture. Accordingly, KAR-2 binds to a novel calmodulin structure created by amino acid residues of both the N- and C-terminal domains of the protein. This conformational change is consistent with its solution structure as characterized by NMR spectroscopy. Interestingly, a complex of similar global structure forms when calmodulin binds KAR-2 or trifluoperazine in spite of the fact that the two ligands mostly associated to different binding domains of calmodulin. These observations give a plausible explanation for the lack of anti-calmodulin activity of KAR-2 and partly for its low toxic side effect observed in single cell as well as in animal experiments.

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	2
RÖVIDÍTÉS.JEGYZÉK	3
BEVEZETÉS.....	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
A kalmodulin	7
A CaM szerkezete	7
A CaM funkciója.....	10
A CaM kölcsönhatása célfehérjéivel	11
CaM antagonisták.....	13
Az eukarióta sejt mikrotubuláris hálózata	15
Vinca alkaloidok és biológiai hatásuk; a KAR-2.....	17
A TPPP fehérjecsalád	19
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	23
Fehérjék és vegyszerek	23
CaM izolálása marhaagyból.....	23
¹⁵ N -el jelölt rekombináns CaM izolálása	23
TPPP/p25 izolálása marhaagyból	25
Felületi plazmon rezonancia mérések	25
CD spektroszkópia	27
PDE aktivitás mérés.....	28
Fehérjekristályosítás	28
Kristályszerkezet-meghatározás	29
NMR spektroszkópia	29
EREDMÉNYEK	31
CD spektroszkópia	31
Funkcionális vizsgálatok PDE aktivitásméréssel	32
KAR-2 és TFP hatása a CaM - aldoláz kölcsönhatásra	35
TPPP/p25 : egy új CaM célfehérje	37
A CaM – KAR-2 komplex röntgenkrisztallográfiás szerkezete	39
NMR spektroszkópia	43
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	46

HIVATKOZÁSJEGYZÉK.....	51
ÖSSZEFOGLALÓ.....	55
ABSTRACT.....	56
TARTALOMJEGYZÉK.....	57